



PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE *Fasciola hepatica* NOS MUNICÍPIOS DE
PEDRO LEOPOLDO E SÃO JOSÉ DA LAPA - MINAS GERAIS, E
AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM OVINOS DA RAÇA
SANTA INÊS**

**Belo Horizonte
2016**

RUTH MASSOTE DRACZ

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE *Fasciola hepatica* NOS MUNICÍPIOS DE
PEDRO LEOPOLDO E SÃO JOSÉ DA LAPA - MINAS GERAIS, E
AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM OVINOS DA RAÇA
SANTA INÊS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Helminologia.

Orientador: Prof. Dr. Walter do Santos Lima

Co-Orientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Belo Horizonte

2016

Orientador

Dr. Walter dos Santos Lima
Laboratório de Helminologia Veterinária, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG.

Co-Orientador

Dr. Ricardo Toshio Fujiwara
Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG.

Colaboradores

Dr. Anilton César Vasconcelos
Laboratório de Apoptose, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG.

Este projeto foi desenvolvido nos Laboratórios de Helminologia Veterinária e Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Conta também com o apoio do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) do município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, e o auxílio financeiro das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

“A experiência não permite nunca atingir a certeza absoluta. Não devemos procurar obter mais que uma probabilidade.”

Bertrand Russell

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço a Deus, pelos dias de vida concedidos, nos quais pude provar seu amor por mim. E nos quais tive a oportunidade de seguir com fé, esperança, força e determinação meus objetivos até aqui.

E por ter permitido a realização de mais um sonho, que é carregar dentro de mim o meu maior presente: Miguel!

Aos meus pais, Sérgio e Zaudiane, por todo apoio, incentivo e amor. Por estarem ao meu lado, em todos os momentos durante esse trabalho, até mesmo fazendo parte direta dele. Sem este apoio com certeza não teria chegado onde eu tanto almejava!

Ao Giovanni, por toda ajuda, compreensão, amor, cumplicidade, paciência e carinho! E por sempre estar ao meu lado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Prof. Walter dos Santos Lima.

Professor, mais uma vez tenho a oportunidade de expressar o quanto sou grata por todas as oportunidades e aprendizados que tive em minha caminhada ao seu lado! Foram até o momento, oito anos de convivência, desde a iniciação científica, mestrado e agora o doutorado. Durante esse tempo, compartilhamos muitos momentos alegres e de descobertas, e também momentos difíceis e com muito estresse. Mas que sem dúvida todos eles, me proporcionaram grande crescimento pessoal e profissional! Obrigada por acreditar em mim e por sempre me incentivar a dar o meu melhor, mesmo que tenha sido as vezes com suas “broncas”. Elas também me fizeram crescer! Obrigada por me ajudar a chegar até aqui!

Agradeço ao Prof. Ricardo Toshio Fujiwara pela co-orientação. Por ter aberto as portas de seu laboratório mais uma vez para que eu pudesse aprender e realizar parte de meus experimentos. Agradeço também por sempre me atender nos momentos de dificuldade, seja para me ajudar a entender e discutir um resultado, ou apenas para uma conversa e um conselho. Muito obrigada!

Ao Prof. Anilton César Vasconcelos, pelas importantes e essenciais ajudas na parte de patologia dos meus experimentos. Pelas conversas, explicações e toda atenção que sempre dispensou quando precisei e o procurei!

Agradeço aos colegas e amigos do LAHELNET. Foram anos de convivência com alguns e com outros menos tempo. Mas de forma alguma menos importantes por isso! Uns que já passaram... Outros que ainda permanecem... Mas todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho! Obrigada Eveline, Lanuze, Paula, Aytube, Jordana, Vinicius, Hudson, Lara e Cintia.

A Belinha e Ramon, pela ajuda nas fotografias e análises histológicas.

Ao Ronaldo Sanches, por ajuda com materiais, fotografias e conversas.

A Alpax ao pela doação de materiais.

A Lilian e Michele, e demais colegas do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos – LIGP, pela ajuda no desenvolvimento do experimento e também no esclarecimento das dúvidas.

Aos funcionários do IMA em Pedro Leopoldo, cuja ajuda foi essencial na realização desse trabalho.

A todos os colegas, funcionários e professores do Departamento de Parasitologia, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho. Ao Sr. Neri, pelas conversas e bom humor sempre!

A Sumara e a Cibele, secretárias do Departamento pelo carinho e prontidão em esclarecer todas às dúvidas.

Ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade federal de Minas Gérias, pelo incentivo e apoio na realização desse trabalho.

Ao apoio financeiro da Coordenadoria de aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino superior (CAPES).

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	12
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE GRÁFICOS	19
LISTA DE ANEXOS	22
LISTA DE ABREVIATURAS	23
RESUMO	25
ABSTRACT	27
1. INTRODUÇÃO	29
2. REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1 Classificação taxonômica	31
2.2 Ciclo Biológico	31
2.3 Hospedeiros intermediários da <i>Fasciola hepatica</i>	32
2.4 Hospedeiros definitivos da <i>Fasciola hepatica</i>	36
2.5 Distribuição no Brasil	38
2.6 Epidemiologia	42
2.7 Interação parasito-hospedeiro	44
2.8 Diagnóstico	46
3. JUSTIFICATIVA	47
4. OBJETIVOS	48
4.1 Objetivo geral	48
4.2 Objetivos específicos	48
CAPITULO 1 - Causas de condenação e avaliação patológica de fígados infectados por <i>Fasciola hepatica</i> inspecionados em frigorífico da região central do estado de Minas Gerais	50
1. Introdução	51
2. Material e Métodos	52
2.1 Coleta de dados	52

2.2 Avaliação macroscópica e microscópica de fígados parasitados por <i>Fasciola hepatica</i>	52
3. Resultados	53
3.1 Causas de condenação	53
3.2 Avaliação macroscópica	55
3.3 Avaliação microscópica	58
4. Discussão	61
5. Referências bibliográficas	64

CAPITULO 2 - *Fasciola hepatica* em bovinos e bubalinos nos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, região central do estado de Minas Gerais

1. Introdução	68
2. Material e métodos	69
2.1 Prevalência de <i>Fasciola hepatica</i> e fatores associados à infecção	69
2.1.1 Área de estudo	69
2.1.2 Determinação da prevalência de <i>Fasciola hepatica</i>	70
2.1.3 Coleta e exame das fezes	70
2.1.4 Técnica de Quatro Tamises Metálicos	71
2.1.5 Caracterização das propriedades	71
2.1.6 Variáveis de estudo	72
2.1.6.1 Variável dependente	72
2.1.6.2 Variáveis independentes	72
2.1.7. Análise dos dados	73
2.2 Avaliação da viabilidade dos ovos e miracídios	74
2.3 Coleta de <i>Lymnaea</i> e avaliação da infecção natural por <i>Fasciola hepatica</i>	74
3. Resultados	75
3.1 Prevalência de <i>Fasciola hepatica</i>	75
3.1.1 Prevalência de <i>Fasciola hepatica</i> nos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa	75
3.1.2 Caracterização das propriedades estudadas	82
3.1.3 Variáveis relacionadas ao meio ambiente e a infecção por <i>Fasciola hepatica</i>	83

3.1.4 Variáveis relacionadas ao manejo do rebanho e a infecção por <i>Fasciola hepatica</i>	85
3.1.5 Análise dos fatores associados à infecção por <i>Fasciola hepatica</i>	87
3.1.5.1 Análise univariada	87
3.1.5.2 Análise multivariada	90
3.2 Viabilidade dos ovos e miracídios obtidos	91
3.3 Coleta de <i>Lymnaea</i> e taxa de infecção natural por <i>Fasciola hepatica</i>	93
4. Discussão	97
5. Referências bibliográficas	101
6. Anexos	105

CAPITULO 3 - Aspectos parasitológicos, hematológicos e imunológicos de ovinos da raça Santa Inês experimentalmente infectados por *Fasciola hepatica* 119

1. Introdução	120
2. Material e métodos	121
2.1 Ovinos e infecções experimentais	121
2.2 Avaliação parasitológica	121
2.3 Avaliação hematológica	122
2.4 Avaliação imunológica	122
2.4.1 Obtenção e separação de células mononucleares do sangue periférico	123
2.4.2 Preparação de antígeno de excreção e secreção de <i>Fasciola hepatica</i>	123
2.4.3 Preparação de antígeno bruto solúvel de <i>Fasciola hepatica</i>	124
2.4.4 Cultura de células mononucleares do sangue periférico	124
2.4.5 Dosagem de TGF- β 1 em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico	124
2.4.6 Dosagem de óxido nítrico em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico	125
2.4.7 Dosagem de anticorpos IgG no plasma dos ovinos	126
2.5 Alterações macroscópicas e microscópicas	127
2.6 Análise estatística	127
3. Resultados	128

3.1 Avaliação parasitológica	128
3.2 Avaliação hematológica	129
3.2.1 Hemograma	129
3.2.1.1 Hemácias	129
3.2.1.2 Hemoglobina	130
3.2.1.3 Hematócrito	131
3.2.1.4 Volume Corpuscular Médio	132
3.2.1.5 Concentração Média de Hemoglobina	133
3.2.1.6 Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média	134
3.2.2 Leucograma	135
3.2.2.1 Contagem Global de Leucócitos	135
3.2.2.2 Linfócitos	136
3.2.2.3 Neutrófilos	137
3.2.2.4 Eosinófilos	138
3.2.2.5 Monócitos	139
3.3 Avaliação Imunológica	140
3.3.1 Dosagem de TGF- β 1	140
3.3.2 Dosagem de óxido nítrico	142
3.3.3 Dosagem de IgG no plasma de ovinos	144
3.4 Alterações macroscópicas e microscópicas	146
4. Discussão	150
5. Referências bibliográficas	155
5. CONCLUSÕES	160
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161

LISTA DE QUADROS

INTRODUÇÃO

QUADRO 1 - Espécies de <i>Lymnaea</i> descritas naturalmente infectadas por formas larvais de <i>Fasciola hepatica</i> , em alguns países	33
--	----

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1 Causas de condenação e avaliação patológica de fígados infectados por *Fasciola hepatica* inspecionados em frigorífico da região central do Estado de Minas Gerais

TABELA 1 - Valores totais e médias de bovinos abatidos, número de fígados condenados e o percentual de condenações nos anos de 2011 a 2015 em matadouro no município de Pedro Leopoldo – MG 53

TABELA 2 - Número total de fígados bovinos condenados na linha de inspeção em matadouro no município de Pedro Leopoldo – MG, nos anos de 2011 a 2015, causas de condenações e suas respectivas porcentagens 54

CAPITULO 2 *Fasciola hepatica* em bovinos e bubalinos nos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, região central do estado de Minas Gerais

TABELA 1 - Número total de amostras de fezes coletadas de bovinos e bubalinos nas propriedades visitadas no município de Pedro Leopoldo, MG, número de amostras positivas para ovos de *Fasciola hepatica* e porcentagem de positividade em cada propriedade..... 76

TABELA 2 - Número total de amostras de fezes coletadas de bovinos e bubalinos nas propriedades visitadas no município de São José da Lapa, MG, número de amostras positivas para ovos de *Fasciola hepatica* e porcentagem de positividade em cada propriedade 79

TABELA 3 - Infecção por *Fasciola hepatica* nas propriedades rurais dos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, MG, segundo variáveis relacionadas à fatores ambientais observados 84

TABELA 4 - Infecção por *Fasciola hepatica* nas propriedades rurais dos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, MG, segundo variáveis relacionadas ao manejo dos rebanhos 86

TABELA 5 - Odds Ratio (OR) e valor de p dos fatores ambientais em relação à infecção pela *Fasciola hepatica* nos animais nas propriedades rurais dos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, Minas Gerais 88

TABELA 6 - Odds Ratio (OR) e valor de p das características de manejo do rebanho em relação à infecção pela *Fasciola hepatica* nos animais nas propriedades rurais dos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, Minas Gerais 89

TABELA 7 - Modelo final de regressão logística das variáveis independentes pesquisadas em relação à infecção por *Fasciola hepatica* nos animais nas propriedades rurais nos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, MG 90

TABELA 8 - Total de exemplares de *Lymnaea* spp. coletados nas propriedades rurais estudadas nos municípios de Pedro Leopoldo (PL) e São José da Lapa (S JL), MG e local onde os moluscos foram encontrados 94

CAPITULO 3 Aspectos parasitológicos, hematológicos e imunológicos de ovinos da raça Santa Inês experimentalmente infectados por *Fasciola hepatica*

TABELA 1 - Número de ovos por grama de fezes (OPG) dos ovinos experimentalmente infectados por 150 metacercárias de *Fasciola hepatica*, aos 30, 60, 90, 120 e 150 dias após infecção (dpi) 128

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1 Causas de condenação e avaliação patológica de fígados infectados por *Fasciola hepatica* inspecionados em frigorífico da região central do Estado de Minas Gerais

FIGURA 1 - Fígado de bovino naturalmente infectado por *Fasciola hepatica* proveniente do município de Pedro Leopoldo, MG, com lesões decorrentes da infecção. A) Depressão (Dp) e áreas de fibrose (asterisco) na capsula hepática. B) Áreas de fibrose (asterisco). C) Pontos de necrose (seta preta). D) Ducto hepático com intensa ectasia, espessamento e mineralização, contendo no lúmen material com grânulos pretos e secreção amarelada (Dh) 56

FIGURA 2 - Fígado de bovino naturalmente infectado por *Fasciola hepatica* proveniente do município de Pedro Leopoldo, MG, com lesões decorrentes da infecção. A) Ductos hepáticos com espessamento da parede e dilatação do lúmen (cabeça de seta). B) Ducto hepático com espessamento da parede (estrela) e no interior a presença de secreção amarelada contendo granulo pretos (S). C) Parasitos adultos (P) no ducto biliar com ectasia do lúmen (estrela). D) Exemplares e *F. hepatica* coletados dos ductos biliares 57

FIGURA 3 - Fígado de bovino naturalmente infectado por *Fasciola hepatica* proveniente do município de Pedro Leopoldo, MG. A) Intensa área de fibrose (asterisco). Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 10x; Barra= 64 micra). B) Maior aumento da imagem anterior. Fibroplasia (asterisco) formando feixes fibrosos que se coalescem caracterizando o “trajeto do parasito” (seta amarela) durante migração pelo parênquima hepático. Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 20x; Barra= 32 micra). C) Visão do espaço porta (EP), veia centrolobular (VC) e feixes fibrosos periportais que se interconectam caracterizando o “trajeto do parasito” (seta amarela). Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 10x; Barra= 64 micra). D) Detalhe do espaço porta (EP), com ramos da veia porta (VP) associada a moderada fibrose (asterisco) e infiltrado inflamatório (seta preta) na área periportal (estrela). Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 20x; Barra= 32 micra) 59

FIGURA 4 - Fígado de bovino naturalmente infectado por *Fasciola hepatica* proveniente do município de Pedro Leopoldo, MG. A) Intensa proliferação de ductos biliares (seta amarela) entremeados por fibroplasia (asterisco). Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 10x; Barra= 64 micra). B) Ectasia e fibrose periductal (asterisco) em torno de ramo de ducto biliar (rDB), no lúmen há restos celulares e material amorfo basofílico. Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 40x; Barra= 16 micra). C) Extensa área de fibrose (asterisco) e ramo de artéria com trombo-embolo (TE). Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 40x; Barra= 16 micra). D) Corte longitudinal do parasito. Pode-se observar o tegumento com espinhos (seta) e útero com presença de ovos (Ov). A parede do ducto está espessa devido a fibrose (asterisco) e há presença de remanescentes de epitélio biliar hiperplásico (seta amarela). Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 4x; Barra= 128 micra)

..... 60

CAPITULO 2 *Fasciola hepatica* em bovinos e bubalinos nos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, região central do estado de Minas Gerais

FIGURA 1 - Localização dos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa na região central do estado de Minas Gerais, Brasil. Fonte: IGA – Instituto de Geociências Aplicadas, 2015 70

FIGURA 2 - Mapa de dados georreferenciados mostrando a localização das propriedades rurais onde foram realizadas buscas por bovinos e bubalinos naturalmente infectados por *Fasciola hepatica* no município de Pedro Leopoldo, MG 78

FIGURA 3 - Mapa de dados georreferenciados evidenciando propriedades rurais com bovinos e bubalinos positivos e negativos ao exame coproparasitológico para *Fasciola hepatica*, no município de Pedro Leopoldo, MG 78

FIGURA 4 - Mapa de dados georreferenciados mostrando a localização das propriedades rurais onde foram realizadas buscas por bovinos e bubalinos naturalmente infectados por *Fasciola hepatica* no município de São José da Lapa, MG 80

FIGURA 5 - Mapa de dados georreferenciados evidenciando propriedades rurais com bovinos e bubalinos positivos e negativos ao exame coproparasitológico para *Fasciola hepatica*, no município de São José da Lapa, MG 80

FIGURA 6 - A) Ovo de *Fasciola hepatica* recuperado das fezes de bovinos e bubalinos naturalmente infectado (100X). B) Ovo de *F. hepatica* após incubação, com miracídios em seu interior (10X) 91

FIGURA 7 - Cercárias de *Fasciola hepatica* que emergiram de *Lymnaea columella* infectada com dois miracídios (40X) 92

FIGURA 8 - Metacercária de *Fasciola hepatica* obtida de *Lymnaea columella* infectada com dois miracídios (100X) 92

FIGURA 9 - A) Metacercárias de *Fasciola hepatica* encistadas na concha de *Lymnaea columella* (20X). B) Metacercárias de *F. hepatica* encistadas em folha de alface (10X) 93

FIGURA 10 - Rédia de *Fasciola hepatica* recuperada de *Lymnaea columella* naturalmente infectado (100X) 96

CAPITULO 3 Aspectos parasitológicos, hematológicos e imunológicos de ovinos da raça Santa Inês experimentalmente infectados por *Fasciola hepatica*

FIGURA 1 - Fígado de ovino experimentalmente infectado com 150 metacercárias de *Fasciola Hepatica*, aos 97 dias pós-infecção. (A e B) Face externa do fígado, contendo extremidade anterior do parasito adulto, rompendo a cápsula do fígado (seta amarela). (C) Secção longitudinal do exemplar adulto de *Fasciola hepatica* mostrado na imagem A e B. O parasito é revestido por tegumento, centralmente encontra-se o ceco envolto por parênquima mesenquimatoso (asterisco). Na extremidade anterior encontra-se a ventosa ventral (cabeça de seta) (Aumento: 4x; 164µm) 147

FIGURA 2 - Fígado de ovino experimentalmente infectado com 150 metacercárias de *Fasciola Hepatica*, aos 97 dias pós-infecção. (A) Corte transversal de um parasito (estrela) no lúmen de um ducto com hiperplasia do epitélio e fibrose periductal (asterisco amarelo) (Aumento: 4x; Barra: 164µm). (B) Maior aumento do parasito (estrela) mostrado na Figura A. Processo infamatório crônico difuso na parede do ducto e se estendendo para o parênquima hepático associado à processo inflamatório crônico difuso no parênquima hepático (asterisco amarelo) e fibroplasia (cabeça de seta) (Aumento: 10x; Barra: 64µm). (C) Detalhe do tegumento do parasito com espinhos (seta amarela) (Aumento: 20x; Barra: 32µm). (D) Fragmentos de ovos (OP) no interior do útero do parasito (Aumento: 20x; Barra: 32µm) 148

FIGURA 3 – Fotomicrografia do fígado de ovino experimentalmente infectado com 150 metacercárias de *Fasciola Hepatica*, aos 97 dias pós-infecção. (A) Área extensa de fibrose (asterisco) e proliferação de ductos biliares associada a intenso infiltrado inflamatório (asterisco amarelo) adjacente ao espaço porta (EP) e tecido hepático normal (estrela) (Aumento: 4x; Barra: 164µm). (B) Espaço porta com presença de ramos da artéria hepática (rAH), ramo da veia porta (rVP) e ramos do ducto biliar (rDB) podendo se observar, no interior de um dos ramos, a presença de fragmentos de ovos do parasito *Fasciola hepatica* (seta amarela). Adjacente há tecido hepático normal (estrela) (Aumento: 4x; Barra: 164µm). (C) Ducto biliar (rDB) seccionado transversalmente e contendo no lúmen fragmentos de ovos do parasito (seta amarela) (Aumento: 10x; Barra: 64µm). (D) Segmento do fígado (estrela) com presença de inflamação difusa (asterisco amarelo), fibroplasia (cabeça de seta) e ramos de ducto biliar (rDB) (Aumento: 10x; Barra: 64µm) 149

LISTA DE GRÁFICOS

CAPITULO 2 *Fasciola hepatica* em bovinos e bubalinos nos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, região central do estado de Minas Gerais

GRÁFICO 1 – Porcentagem de propriedades rurais positivas para *Fasciola hepatica* nos municípios de Pedro Leopoldo (n=50), São José da Lapa (n=15) e a porcentagem total da área estudada (n=65) 81

CAPITULO 3 Aspectos parasitológicos, hematológicos e imunológicos de ovinos da raça Santa Inês experimentalmente infectados por *Fasciola hepatica*

GRÁFICO 1 - Valores médios de hemácias em ovinos infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* (Grupo A) e ovinos não infectados (Grupo B) durante período experimental 129

GRÁFICO 2 - Valores médios da concentração de hemoglobina em ovinos infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* (Grupo A) e ovinos não infectados (Grupo B) durante período experimental 130

GRÁFICO 3 - Valores médios do hematócrito em ovinos infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* (Grupo A) e ovinos não infectados (Grupo B) durante período experimental 131

GRÁFICO 4 - Valores do volume corpuscular médio (VCM) em ovinos infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* (Grupo A) e ovinos não infectados (Grupo B) durante período experimental 132

GRÁFICO 5 - Valores da concentração média de hemoglobina (CMH) em ovinos infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* (Grupo A) e ovinos não infectados (Grupo B) durante período experimental 133

GRÁFICO 6 - Valores da concentração média de hemoglobina (CMCH) em ovinos infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> (Grupo A) e ovinos não infectados (Grupo B) durante período experimental	134
GRÁFICO 7 - Média da contagem global de leucócitos em ovinos infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> (Grupo A) e ovinos não infectados (Grupo B) durante período experimental	135
GRÁFICO 8 - Média da contagem global de linfócitos em ovinos infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> (Grupo A) e ovinos não infectados (Grupo B) durante período experimental	136
GRÁFICO 9 - Média da contagem global de neutrófilos em ovinos infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> (Grupo A) e ovinos não infectados (Grupo B) durante período experimental	137
GRÁFICO 10 - Média da contagem global de eosinófilos em ovinos infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> (Grupo A) e ovinos não infectados (Grupo B) durante período experimental	138
GRÁFICO 11 - Média da contagem global de monócitos em ovinos infectados com 150 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i> (Grupo A) e ovinos não infectados (Grupo B) durante período experimental	139
GRÁFICO 12 - Produção da citocina TGF- β_1 em sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico de ovinos experimentalmente infectados com <i>Fasciola hepatica</i> , estimuladas com antígeno bruto do parasito	140
GRÁFICO 13 - Produção da citocina TGF- β_1 em sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico de ovinos experimentalmente infectados com <i>Fasciola hepatica</i> , estimuladas com antígeno de excreção e secreção do parasito	141

GRÁFICO 14 - Produção de óxido nítrico em sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico de ovinos experimentalmente infectados com *Fasciola hepatica*, estimuladas com antígeno bruto do parasito 142

GRÁFICO 15 - Produção de óxido nítrico em sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico de ovinos experimentalmente infectados com *Fasciola hepatica*, estimuladas com antígeno de excreção e secreção do parasito 143

GRÁFICO 16 - Reatividade de anticorpos IgG anti-antígeno bruto de *Fasciola hepatica*, em densidade óptica (DO) no plasma de ovinos infectados e não infectados no período experimental (0 a 150 dias após infecção) 144

GRÁFICO 17 - Reatividade de anticorpos IgG anti-antígeno de excreção e secreção de *Fasciola hepatica*, em densidade óptica (DO) no plasma de ovinos infectados e não infectados no período experimental (0 a 150 dias após infecção) 145

LISTA DE ANEXOS

CAPITULO 2 *Fasciola hepatica* em bovinos e bubalinos nos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, região central do estado de Minas Gerais

ANEXO 1 – Questionário aplicado aos proprietários ou responsáveis pelas propriedades rurais visitadas no município de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, Minas Gerais, durante levantamento epidemiológico em bovinos e bubalinos 105

ANEXO 2 – Relatório de ensaios – Resultado da identificação de moluscos do gênero *Lymnaea* enviados ao Laboratório de Helminologia e Malacologia Médica da Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisa René Rachou, MG 107

ANEXO 3 – Artigo publicado na Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, descrevendo casos autóctones de bovinos e bubalinos infectados por *Fasciola hepatica* nos municípios de São José da Lapa e Pedro Leopoldo, Minas Gerais 109

ANEXO 4 – Artigo publicado na Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, descrevendo a infecção natural de capivara por *Fasciola hepatica* no município de Confins, Minas Gerais 114

LISTA DE ABREVIATURAS

μg – Micrograma
 μL – Microlitro
 μm – Micrometro
cm – Centímetro
Dpi – Dias após infecção
EDTA - Ácido etilenodiaminatetraacético
ELISA -“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
g – Gravidade
GPS – Sistema de posicionamento global
 H_3PO_4 – Ácido fosfórico
HCl – Ácido clorídrico
HE – Hematoxilina-Eosina
IC – Intervalo de confiança
ICB – Instituto de Ciências Biológicas
IgG – Imunoglobulina G
IL-10 – Interleucina 10
IL-4 – Interleucina 4
IMA – Instituto Mineiro de Agropecuária
INF- γ – Interferon-gamma
Km – Quilômetros
mg – Miligrama
ml – Mililitro
mm – Milímetro
 NaNO_2 – Nitrito de sódio
NaOH – Hidróxido de sódio
ng – Nanograma
nm – Nanômetro
NO – Óxido nítrico
OPD – O-phenylenediamine
OPG – Ovos por grama de fezes
OR – Odds Ratio
PBMCs – Peripheral blood mononuclear cell

PBS – Phosphate buffered saline

pH – Potencial Hidrogeniônico

RPMI 1640 – Meio de cultura desenvolvido por “Roswell Park Memorial Institute”

TGF- β - Fator de crescimento transformador-Beta

TNF- α - Fator de necrose tumoral-alfa

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

W - Watts

RESUMO

Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758) é um trematódeo digenético que parasita o parênquima hepático e ductos biliares de ruminantes e outros mamíferos, inclusive o homem. É o agente etiológico da fasciolose, uma doença de grande importância na medicina veterinária por causar perdas econômicas na pecuária. No Brasil, a fasciolose apresenta-se em expansão, com a maior área enzoótica situada na região Sul, seguida das regiões Sudeste e Centro Oeste. Em Minas Gerais, os registros são descritos de forma isolada e novos casos em regiões antes consideradas indenes têm sido relatados. Este projeto avaliou a ocorrência do parasito em rebanhos bovinos e bubalinos nos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, localizados na região metropolitana de Belo Horizonte. Foram realizados levantamentos referentes às condenações de fígados em frigorífico, exame de amostras de fecais dos rebanhos em propriedades rurais e análise da infecção natural pelo parasito em moluscos do gênero *Lymnaea*. Foram observados fígados condenados devido ao parasitismo por *F. hepatica* em bovinos e bubalinos provenientes desses municípios. No inquérito epidemiológico, 65 propriedades rurais foram visitadas, das quais 29 apresentaram pelo menos um ruminante naturalmente infectado. Dos moluscos coletados, 0,3% estavam infectados por *F. hepatica*. Para se compreender melhor aspectos dessa interação parasito-hospedeiro, ovinos da raça Santa Inês foram experimentalmente infectados e acompanhados durante as fases aguda e crônica da infecção, com a avaliação de parâmetros parasitológicos, hematológicos e imunológicos. Os ovinos se mostraram susceptíveis à infecção eliminando ovos nas fezes em torno de 60 dpi. Esses animais apresentaram anemia e eosinofilia durante o período experimental. As citocinas TGF- β_1 e óxido nítrico (NO), típicas da resposta imune inata, foram detectadas no sobrenadante de cultura de PBMCs durante a fase aguda e crônica da infecção. A participação de IgG também foi avaliada e observou-se que esse anticorpo é produzido em taxas elevadas no início da infecção, e que seus valores decaem ao longo do tempo, demonstrando que essa resposta não promove proteção ao hospedeiro contra o parasito. Com base nos dados obtidos, concluiu-se que *F. hepatica* está em expansão em Minas Gerais. Bovinos, bubalinos e moluscos *Lymnaea* são encontrados naturalmente infectados nos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, comprovando a ocorrência do ciclo do parasito na região, podendo ser fonte de contaminação para áreas próximas. Ovinos da raça Santa Inês são susceptíveis a infecção, ocorrendo alterações

hematológicas e imunológicas significativas no decorrer da infecção, sugerindo uma resposta mista do tipo Th1 e Th2 na fase crônica da fasciolose.

Palavras-chave: *Fasciola hepatica*, Epidemiologia, Bovinos, Bubalinos, *Lymnaea*.

ABSTRACT

Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758) is a digenetic trematode that parasitizes the hepatic parenchyma and bile ducts of ruminants and other mammals, including humans. It is the etiologic agent of *fasciolosis*, a disease of great importance in veterinary medicine, due to economic losses in livestock. *Fasciolosis* is expanding in Brazil with the biggest enzootic area is situated in the south, followed by the southeast and center-west regions. In Minas Gerais, registers are noted in an isolated manner and new cases in regions once considered unaffected have been reported. This project evaluated the occurrence of the fluke in cattle and buffalo herds in the municipalities of Pedro Leopoldo and São José da Lapa, located in the metropolitan region of Belo Horizonte. Surveys were conducted concerning the condemnation of livers in slaughterhouse, the examination of faecal samples in herds from rural properties and natural infection analysis by the fluke in snails of the genus *Lymnaea*. Condemned livers were observed due to parasitism by *F. hepatica* in cattle and buffaloes from those municipalities. During epidemiological inquiry, a total of 65 rural properties were visited, whence 29 presented at least one ruminant naturally infected. 0.3% of snails collected were infected by *F. hepatica*. For better understanding of the aspects of this host-parasite interaction, sheep from *Santa Inês* breed were experimentally infected and followed during the acute and chronic phases of the infection, with the evaluation of parasitological, hematological and immunological parameters. The sheep show themselves susceptible to infection, eliminating eggs in the faecal sample around 60 dpi. These animals presented anemia and eosinophilia during experimental period. Cytokines TGF- β_1 and nitric oxide (NO), typical of an innate immune response, were detected in PBMC culture supernatants during the acute and chronic phases of the infection. Participation of IgG was also evaluated, and it was observed that this antibody is produced in high taxes at the beginning of infection, and its values decline over time, demonstrating that this response does not provide protection to the host against the fluke. Based on the obtained data, it was concluded that *F. hepatica* is in expansion in Minas Gerais. Cattle, buffaloes and snails *Lymnaea* are naturally found infected in the municipalities of Pedro Leopoldo and São José da Lapa, proving the occurrence of the fluke life cycle in the region, which may be a source of contamination for nearby areas. Sheep from *Santa Inês* breed are susceptible to infection, with the occurrence of significant hematological and immunological alterations throughout the infection, suggesting a mixed Th1-Th2-type response in the chronic phase of *fasciolosis*.

Key words: *Fasciola hepatica*, Epidemiology, Cattle, Buffaloes, *Lymnaea*.

1. INTRODUÇÃO

Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758) é um trematódeo digenético parasita das vias biliares de ovinos, bovinos, bubalinos, caprinos e outros mamíferos. É o agente etiológico da fasciolose que apresenta ampla distribuição mundial e grande importância na medicina veterinária e humana.

Na medicina veterinária, a fasciolose é considerada uma doença que representa um sério problema às criações de ruminantes domésticos, promovendo perdas e prejuízos econômicos decorrentes das condenações de fígados em abatedouros, queda na produtividade de leite, carne e lã, redução no crescimento, queda na fertilidade, abortos, infecções bacterianas secundárias, morte de animais, e altos gastos com medicamentos utilizados no controle da parasitose (Lima et al., 2009).

Na medicina humana, essa zoonose é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde como um problema para trabalhadores rurais residentes em áreas enzoóticas. O homem, quando parasitado apresenta quadro clínico semelhante ao observado nos animais. Os relatos de infecção indicam que os casos humanos, em geral acompanham a distribuição da doença em animais, especialmente nas regiões onde a população humana e o rebanho compartilham a água, ou quando há o consumo de plantas e hortaliças de áreas alagadas, como o agrião contaminado por metacercárias do parasito (Müller et al., 1998; Pile et al., 2000; Robinson & Dalton 2009; Dutra et al., 2010).

No Brasil essa parasitose apresenta-se em expansão sendo que a maior área enzoótica está situada nos estados da região Sul, seguida aos das regiões Sudeste e Centro Oeste do país (Faria et al., 2005, Medeiros et al, 2014). Em Minas Gerais, os registros do parasito surgem de forma isolada, sendo que o município de Itajubá, é uma área reconhecidamente enzoótica para a fasciolose bovina, onde tem-se registrado altas taxas de prevalência da parasitose. Entretanto em outros municípios do estado tem sido relatado novos casos em regiões antes consideradas indenes, indicando a possibilidade do surgimento de novas áreas de transmissão e disseminação da fasciolose (Lima et al. 2009; Dracz & Lima, 2014).

Com base nos dados disponíveis na literatura relacionados à expansão da fasciolose no Brasil, reforça-se a importância do conhecimento de novas áreas e focos da doença e também dos principais fatores epidemiológicos relacionados à dispersão e prevalência da fasciolose no estado de Minas Gerais e dos diversos mecanismos envolvidos nas

interações entre os hospedeiros e o parasito. Que poderiam auxiliar na formulação de programas e medidas mais eficazes para controle e prevenção da doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação taxonômica

Segundo Yamaguti, 1961 a espécie *Fasciola hepatica* pertence ao:

Reino Animalia

Filo Platyhelminthes

Classe Trematoda (Rudolphi, 1808)

Sub-Classe Digenea (Van Beneden, 1858)

Família Fasciolidae (Railliet, 1895)

Sub-Família Fasciolinae (Hassal, 1898)

Gênero *Fasciola* (Linnaeus, 1758)

Espécie *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758)

2.2 Ciclo biológico

O ciclo biológico desse trematódeo é heteróxico e depende da presença de hospedeiros definitivos, de hospedeiros intermediários e de condições ambientais, climáticas e hidrográficas favoráveis.

Os hospedeiros definitivos se infectam ao ingerirem as metacercárias encistadas em algum substrato, geralmente vegetações aquáticas. No trato digestivo, as metacercárias desencistam e os parasitos imaturos atravessam as paredes do intestino delgado, alcançam a cavidade abdominal e o fígado, atravessam a cápsula hepática e iniciam migrações pelo parênquima. Entre 35 a 45 dias os parasitos permanecem migrando pelo parênquima hepático, alimentando-se de sangue e tecido. Após esse período, alcançam os ductos biliares onde atingem a maturidade. Nos ductos biliares, mais ou menos 50-60 dias após a infecção iniciam a postura dos ovos que passam juntamente com a bile para os intestinos e são eliminados junto com as fezes do hospedeiro. No meio ambiente, em condições ideais de temperatura, umidade e oxigenação, os ovos passam por desenvolvimento embrionário originando após o período médio de oito a 14 dias a larva denominada miracídio. O miracídio eclode em ambiente aquático e desloca-se por movimentos ciliares, penetrando nas partes moles do hospedeiro intermediário, moluscos do gênero *Lymnaea*. Assim que penetra no molusco o miracídio perde os cílios e é iniciada a

reprodução assexuada do parasito sob a forma de esporocisto, um saco alongado contendo células germinativas, que originam formas evolutivas denominadas rédias. As rédias, migram para a glândula digestiva do corpo do molusco. Nesse local, alimentam-se e originam as cercárias. As cercárias maduras abandonam as rédias pelo poro de nascimento e migram para o tegumento, de onde emergem. No ambiente aquático as cercárias, que possuem uma cauda, deslocam-se ativamente e se fixam a um substrato onde encistam, originando as metacercárias, que são as formas infectantes para o hospedeiro definitivo (Paraense 1983; Mas-Coma & Bargues, 1997; Rojo-Vazquez et al. 2012).

2.3 Hospedeiros intermediários da *Fasciola hepatica*

No ciclo biológico desse trematódeo, como já descrito acima, há o envolvimento de moluscos da família Lymnaeidae como hospedeiros intermediários. No entanto, a sistemática atual desses moluscos não é clara, não existindo consenso geral entre os autores.

Uma das formas de identificação e diferenciação das espécies desse grupo é realizada principalmente pelo uso da morfologia clássica em estudos comparativos da concha, sistema reprodutor, sistema renal e rádula. Algumas dificuldades podem ser listadas no decorrer desse processo, como a influência que o meio ambiente exerce, definindo morfotipos distintos para uma mesma espécie, a necessidade de quantidade razoável de exemplares para serem dissecados para correta identificação, e pela habilidade em dissecar, que é dificultada pelo pequeno tamanho de algumas espécies. Dessa forma, é provável que muitas espécies descritas como distintas, sejam na verdade uma única espécie. Outro método de diagnóstico é pelo emprego de técnicas de biologia molecular. Essa ferramenta auxilia na caracterização e identificação das espécies e produz resultados eficientes.

Em estudos sobre limneídeos, são reconhecidos três gêneros na região Neotropical: *Lymnaea*, *Pseudosuccinea* e *Galba*. Entretanto devido à pequena resolução sistemática e discordância de dados obtidos, cada autor propõe uma classificação, não havendo consenso para o melhor arranjo taxonômico desse grupo que apresenta sistemática tratada de acordo com o critério utilizado por cada pesquisador (Bargues et al., 2001; Correa et al., 2010; Vinarski, 2013).

Portanto é comum encontrar na literatura publicações sobre *Pseudosuccinea columella*, *Lymnaea columella* e *Galba columella* por exemplo. Neste trabalho, será utilizada a nomenclatura descrita por cada autor em seus respectivos artigos.

Em relação as características gerais dos limneídeos pode-se citar que possuem concha dextrógira, cônica, alongada, fina, com giros convexos, suturas rasas ou profundas, abertura oval ou arredondada e medem de 11 a 15 mm de altura (Thiengo & Fernandez, 2007).

Normalmente são encontrados em áreas irrigadas que oferecem condições adequadas para proliferação, como lagoas, valas de irrigação, pastagens alagadiças e pantanosas, principalmente com águas lentas e superficiais (Paraense, 1982).

Diversas espécies são encontradas com infecção natural por *F. hepatica* em diversos países do mundo, como pode ser observado no Quadro 1.

QUADRO 1 - Espécies de *Lymnaea* descritas naturalmente infectadas por formas larvais de *Fasciola hepatica*, em alguns países.

Espécies de <i>Lymnaea</i>	País	Referências
<i>Lymnaea truncatula</i> <i>Lymnaea ovata</i> <i>Lymnaea glabra</i>	França	Abrous et al. 2000 Dreyfuss et al. 2002
<i>Lymnaea cousini</i>	Equador	Vilavicencio & Vasconcelos, 2006
<i>Lymnaea columella</i> <i>Lymnaea viatrix</i>	Argentina	Prepelitchi et al. 2003 Kleiman et al. 2004b
<i>Lymnaea viatrix</i> <i>Lymnaea cubensis</i>	Bolívia	Ueno et al. 1975
<i>Lymnaea (Fossaria) humilis</i>	México	Cruz-Mendoza et al. 2004
<i>Lymnaea truncatula</i>	Suíça	Schweizer et al. 2007
<i>Lymnaea columella</i>	Cuba	Gutierrez et al. 2011
<i>Lymnaea truncatula</i>	Espanha	Manga-Gonzalez et al. 1991
<i>Lymnaea cousini</i>	Colômbia	Velázquez 2006
<i>Lymnaea viridis</i> <i>Lymnaea swinhoi</i>	Vietnã	Nguyen et al. 2012

As espécies que ocorrem no Brasil são: *Lymnaea columella*, *Lymnaea rupestris*, *Galba viatrix*, *Galba cubensis* e *Galba truncatula*, sendo *L. columella* a mais comum e distribuída nas regiões Sul e Sudeste, com poucos registros nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste. *Galba viatrix*, *G. cubensis* e *G. truncatula* foram identificadas nas

regiões Sul e Sudeste, mas sem registros para o Centro-Oeste, Norte e Nordeste. É descrita apenas uma ocorrência no Sul de *L. rupestris* (Medeiros et al., 2014).

No Brasil a primeira referência ao hospedeiro intermediário da *F. hepatica* foi realizada por Lutz em 1921, no estado do Rio de Janeiro, onde o autor descreveu o encontro de rédias e cercárias em espécimes de *Lymnaea* spp. naturalmente infectados.

Resende et al. (1973) citam alguns exemplares de *L. cubensis* e *L. columella* naturalmente infectados, em municípios do Rio de Janeiro, locais em que, anteriormente, haviam sido relatados casos de fasciolose em bovinos. Gonzáles et al., (1974), referem-se a *L. columella* como hospedeiro intermediário, naturalmente infectado com *F. hepatica*, no Rio Grande do Sul.

No Vale do Paraíba, estado de São Paulo, Ueta (1980b), pesquisando a infecção natural de exemplares de *L. columella*, observou uma porcentagem de 1,22% e 0,14% de positividade nos caramujos coletados nos anos de 1977 e 1978, respectivamente. Amato et al. (1986), realizando levantamento epidemiológico da infecção natural por *F. hepatica* em *L. columella*, observou uma porcentagem de positividade variando de 6,25 a 17,91% nos três anos do estudo, também no Vale do Paraíba.

Silva et al. (1995) fizeram o primeiro registro de *L. columella* naturalmente infectada por estádios larvares de *F. hepatica* no estado de Minas Gerais, em região de várzea no município de Itajubá. Os autores observaram que, dentre os moluscos coletados e examinados, 2,29% mostraram-se positivos para rédias e cercárias do parasito.

No estado do Rio de Janeiro, Gomes et al. 2002, relataram 5,22% de caramujos positivos entre os 134 exemplares coletados, provenientes de uma propriedade rural com casos de fasciolose bovina, no município de Campos dos Goytacazes.

Oliveira et al (2002), no estado de São Paulo, ao analisarem exemplares de moluscos colhidos nos municípios de Miracatu e Eldorado, localizados no Vale do Ribeira, observaram taxas de 5,26% e 1,06%, respectivamente, de infecção natural em *L. columella* por formas infectantes de *F. hepatica*.

Novamente no estado de Minas Gerais, no município de Itajubá, Coelho & Lima (2003) relataram a dinâmica populacional de *L. columella* e a taxa de infecção natural desses moluscos entre setembro de 1999 e dezembro de 2000. Observaram que a taxa de infecção natural variou de 0,9 a 5,2% entre os meses do estudo.

Lima et al. (2009) em estudo sobre a ocorrência de *F. hepatica* em 120 municípios do estado de Minas Gerais, observaram a presença de *L. columella*, em 13 municípios. Entretanto, espécimes positivos foram encontrados apenas no município de Itajubá,

confirmando novamente ser essa uma região endêmica para a fasciolose. Os autores observaram que entre os 135 espécimes coletados, quatro (2,96%) estavam positivos e apresentavam formas larvais do parasito.

Ainda no estado de Minas Gerias, certificando a crescente e gradativa dispersão do parasito, Dracz & Lima (2014) relataram a presença de *L. columella* naturalmente infectada no município de São José da Lapa, vetor norte da região metropolitana de Belo Horizonte, área antes considerada indene no estado.

A participação dos limneídeos como potencial hospedeiro intermediário no ciclo da *F. hepatica* no país, também foi confirmada e demonstrada em laboratório a partir de infecções experimentais por vários autores.

Ueta (1980a) utilizando os ovos de *F. hepática* recolhidos em bile e fezes de bovinos e em bile de coelhos, infectou experimentalmente 233 exemplares de *L. columella* medindo 5 a 11 mm de comprimento. A autora relatou que apenas 3% dos espécimes infectados sobreviveram até o desenvolvimento completo das cercárias e até a obtenção das metacercárias. A viabilidade das metacercárias ainda foi testada e comprovada em coelhos, que eliminaram ovos nas fezes 78 dias depois.

Dacal et al em 1988, avaliaram a susceptibilidade de diferentes linhagens de *L. columella*, originada de quatro municípios do estado de Minas Gerais, um município do estado do Rio de Janeiro e um município do estado do Rio Grande do Sul, à infecção por miracídios de *F. hepatica*. Os autores observaram que todas as linhagens foram susceptíveis à infecção, sendo, portanto, importantes na manutenção do ciclo onde relatos de fasciolose já foram descritos e na instalação de novos focos em regiões ainda indenenes.

Mendes, (2006) avaliou o desenvolvimento de *F. hepatica* oriundas de bovinos e sagui em *L. columella* baseado na produção de rédias e cercárias e na taxa de sobrevivência dos moluscos. A autora confirmou a susceptibilidade do molusco às infecções e sugere ainda que o hospedeiro vertebrado de origem influencia a produção de ovos pelo parasito, interferindo consequentemente nas taxas de infecção nos hospedeiros intermediários.

Outros parâmetros como tamanho da concha também foram avaliados como fator de influência na infecção dos moluscos. Coelho et al. (2008) além de comprovar a infecção experimental de *L. columella* por *F. hepatica* em laboratório, observam que o tamanho da concha influencia a proporção de moluscos positivos, existindo associação negativa não linear entre tamanho da concha e taxa de infecção.

Coelho et al. (2009) conduziram infecções experimentais de *L. columella* com *F. hepatica* para testar o efeito de associações simpátricas e alopátricas entre parasito e hospedeiro. Os autores utilizaram moluscos e parasitos das regiões sul e sudeste do Brasil e concluíram que a relação parasito-hospedeiro pode variar de acordo com a origem geográfica dos moluscos e parasitos envolvidos na infecção.

2.4 Hospedeiros definitivos da *Fasciola hepatica*

Apesar da importância econômica e epidemiológica, estudos sobre fasciolose são mais abundantes em hospedeiros definitivos vertebrados de importância econômica, principalmente em ruminantes como bovinos e ovinos, e quando envolvem infecção humana. Esses relatos têm sido extensivos e bem documentados na literatura. Segundo Costa et al. (1986), o parasito já foi identificado em equinos, bovinos, bubalinos, ovinos, caprinos, suínos e roedores.

Entre os roedores, destacam-se as capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) que têm sido descritas como reservatórios silvestres e fonte de contaminação ambiental e de outros animais, uma vez que apresentam distribuição coincidente com ambientes aquáticos lênticos, como remansos de rios, lagos, represas e pântanos, fator indispensável no desenvolvimento do ciclo da fasciolose (Alho et al. 1987). Apresentam adaptabilidade a ambientes alterados fazendo com que consigam sobreviver também nos grandes centros urbanos e regiões antropizadas (Ferraz et al. 2009).

Os autores Santarém et al. (2006), relataram a ocorrência de parasitos adultos no fígado de um exemplar adulto de capivara encontrado morto e proveniente do parque municipal do município de Presidente Prudente em São Paulo. O parasito foi identificado como *F. hepatica*, e durante a necropsia foram observadas lesões hepáticas características da infecção, entretanto não foram recuperados ovos nas fezes.

El-Kouba et al. (2008), estudando a presença de ovos de *F. hepatica* em capivaras provenientes de três parques no município de Curitiba, Paraná, encontraram uma prevalência variando de 0 a 100% nas amostras coletadas das populações residentes nesses parques.

Bellato et al. (2009), estudaram a ocorrência do parasito nas populações de bovinos e capivaras em 19 propriedades rurais no Município de Timbó, Santa Catarina. Os autores relataram a ocorrência de 18,12% de bovinos e de 8,96% de capivaras naturalmente infectadas por *F. hepatica*. O autor ainda ressalta que as diferenças podem ser justificadas

pela diversidade de condições ambientais e pelo manejo e topografia dos locais em que foram realizados os estudos.

Outras espécies de roedores também foram descritas como hospedeiros de *F. hepatica*. Silva Santos et al., (1992) relataram que em uma área com incidência de fasciolose em bovinos no município de Dom Pedrito, Rio Grande do Sul, foram capturados e necropsiados 103 exemplares de rato do banhado (*Myocastor coypus*). Na necropsia a presença de *F. hepatica* no fígado foi observada em 5 (4,85%) espécimes. Segundo os autores, embora a baixa porcentagem de *M. coypus* portadores do parasito, a contaminação das pastagens com fezes contendo ovos de *F. hepatica* são aparentemente maiores do que as dos bovinos, uma vez que muitas vezes as fezes do *M. coypus* é disseminada na água ou em ambientes alagadiços, proporcionando condições ideais para desenvolvimento do ciclo biológico do parasito.

El-Kouba et al., (2009) descreveu nove (56,25%) exemplares de nutria (*M. coypus*) naturalmente infectados por *F. hepatica* no município de Curitiba. Os autores enfatizam que na localidade de estudo, o parque municipal Barigüí, a área onde os animais vivem é de livre acesso aos frequentadores do parque, o que facilita a possível infecção humana.

Gayo et al., (2011) descreveram o primeiro relato de nutria (*M. coypus*) naturalmente infectado por *F. hepatica* no Uruguai. Após a necropsia de um exemplar do animal, os autores concluíram que com a elevada carga parasitaria e contagem total de ovos observados, essa espécie confirma o potencial papel como reservatório e disseminador do parasito, devendo ser incluída nos programas de controle da fasciolose no país.

Kleiman et al., (2004a) relataram espécimes de lebre europeia (*Lepus europaeus*) naturalmente infectadas na Argentina. Durante o ano de 1999, 162.328 animais foram abatidos e 0,08% apresentavam formas adultas ou imaturas de *F. hepatica* no ducto biliar ou parênquima hepático. Segundo os autores apesar da baixa ocorrência, o papel da lebre europeia na transmissão do parasito poderia ser importante, se considerado que a espécie é abundante na região e compartilha ambientes com bovinos e com o hospedeiro intermediário.

Alguns trabalhos ainda descrevem que sob condições naturais, *F. hepatica* seria capaz de parasitar e se desenvolver em aves. Soares et al., (2007) relataram a primeira ocorrência de infecção natural de ema (*Rhea americana*) por *F. hepatica*. Em uma área endêmica da região Sul do Brasil, os autores observaram formas adultas do parasito em quatro fígados examinados, que foram condenados por apresentarem lesões

características do parasito, após abate de 50 emas criadas para consumo humano. Os autores também avaliaram emas selvagens em outra área endêmica no Sul do Brasil. Foram coletadas 17 amostras fecais dos animais, e após análise quatro apresentavam ovos de *F. hepatica*. Os autores, citam que a *R. americana* parece ter um importante papel na transmissão da doença para ruminantes e pode colocar em risco medidas de controle da parasitose em áreas endêmicas.

Martínez-Díaz et al., (2013) fizeram um levantamento de parasitos gastrointestinais em ema (*R. americana*) e nandu-de-Darwin (*Rhea pennata*). Foram coletadas 92 amostras fecais de emas e 55 amostras fecais dos nandus. Após análise, foi observado a presença de ovos de *F. hepatica* em menos de 10% nas amostras das emas e menos de 5% nas amostras dos nandus. Os autores ainda citam esse como o primeiro relato da infecção natural em *R. pennata*.

2.5 Distribuição no Brasil

A primeira referência da ocorrência de *F. hepatica* no Brasil foi descrita por Lutz (1921), que assinalou a presença de bovinos e ovinos naturalmente infectados em municípios do estado do Rio de Janeiro. O autor também relatou a ocorrência da infecção natural de moluscos do gênero *Lymnaea*, encontrados parasitados por formas imaturas do parasito (rédias e cercárias).

A partir de então, foram descritos alguns trabalhos sobre a presença e prevalência do parasito no país, baseados principalmente em dados disponíveis de frigoríficos e abatedouros.

Pêcego (1925), verificou em levantamento no estado do Rio Grande do Sul, taxas anuais de 1,9% a 21% de infecção pelo parasito, e prevalência de 11,8% no período de 1918 a 1925 em fígados de bovinos inspecionados em abatedouros.

Oliveira (1932) relatou a ocorrência do parasitismo por *F. hepatica* em 10,6% de 314.853 bovinos abatidos em um frigorífico de um município do estado do Rio Grande do Sul. Silva (1936) observou um índice de 0,23% de fasciolose em 866.180 bovinos examinados em matadouro, no estado do Rio de Janeiro, durante o período de 1927 a 1935.

O primeiro relato de *F. hepatica* no estado de Minas Gerais foi descrito por Carvalho (1940), em um bovino, sem informação de procedência, no município de Viçosa, na Zona da Mata do estado.

Ribeiro (1949) estudou os dados referentes à incidência das causas de rejeição de carcaças e vísceras de bovinos abatidos no Brasil Central nos anos de 1946 e 1947, assim como os prejuízos causados. O autor encontrou taxa de prevalência de 0,03% para *F. hepatica*, no ano de 1946, sobre um total de 1.025.000 bovinos abatidos, e em 1947, uma taxa de 0,003% de positividade sobre o total de 835.000 bovinos abatidos, da mesma região.

Rey (1957) avaliou a prevalência da infecção em bovinos e ovinos do estado do Rio Grande do Sul entre os anos de 1954 e 1956, e encontrou 2,24% de bovinos e 4,25% de ovinos parasitados, sugerindo ainda a participação do molusco *L. viatrix* como provável hospedeiro intermediário da região.

No estado de São Paulo, França (1967) registrou no Vale do Paraíba, o encontro do parasito em 10,1% dos 941 bovinos inspecionados no matadouro municipal de Taubaté.

Ueno et al., (1982), avaliando a importância econômica da fasciolose na exploração pecuária no estado do Rio Grande do Sul, com bases nos dados anuais de condenações de fígados em abatedouros durante o ano de 1979, observaram taxa de infecção 12-13% em bovinos e 7% em ovinos.

A partir da década de 90, trabalhos começaram a ser realizados não somente com base em dados disponíveis de frigoríficos e abatedouros, mas também com a realização de análises coproparasitológicas relatando a dispersão da parasitose no país.

Beck (1993) analisando dados da inspeção em matadouros ou em exames coproparasitológicos no rebanho bovino de diversos estados do país, assinalou a ocorrência do parasito nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais.

No estado de Goiás, Araujo et al., (1995), relatam a ocorrência de bovinos parasitados por *F. hepatica*, abatidos em matadouro, após terem sido submetidos ao regime de engorda no município de Santa Helena. Entretanto, esses animais eram provenientes do estado do Rio Grande do Sul, onde segundo os autores o parasitismo é frequente. Posteriormente, Araujo et al., (2007), também avaliando bovinos abatidos no estado, verificou a presença de exemplares adultos de *F. hepatica* em fígados. Em investigação epidemiológica foi verificada a procedência dos animais, constatando que todos haviam nascido e sido criados nas propriedades de origem, confirmando a infecção autóctone dos animais. Em seis municípios do estado foi confirmada a presença da parasitose, variando de 0,95% a 20% os casos positivos para o parasito.

No estado do Rio Grande do Sul, Marques & Scroferneker (2003), examinaram 482 fígados em um abatedouro no município de Viamão, no sul do estado, sendo 377 fígados de bovinos e 105 de bubalinos. Os autores relataram que os bovinos abatidos eram provenientes de 11 municípios do estado, e entre esses, sete (63,6%) apresentavam animais positivos com taxa de positividade de 10,34%. Os bubalinos abatidos eram provenientes de cinco municípios, sendo que em quatro (80%) foram observados 20% de animais positivos. Cunha et al., (2007), com o objetivo de determinar a prevalência do parasito em ovinos nesse mesmo estado, analisaram os dados de condenação de fígados de 2000 a 2005 obtidos do Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). No ano de 2000 foi observada uma taxa de condenação de 14,57% (18.072/124.078); em 2001 foi de 10,14% (11.998/118.332); em 2002 foi de 10,96% (11.372/103.762); em 2003 foi de 9,96% (10.802/108.461); em 2004 foi de 5,42% (6.245/ 114.596) e em 2005 foi de 2,27% (2.750/ 121.172). A prevalência geral de condenação de fígados por *F. hepatica* foi de 8,87% (61.239/ 690.361) no período estudado.

No estado de Santa Catarina, Serra-Freire e Nuernberg (1992) analisaram amostras de fezes de bovinos, bubalinos, ovinos e caprinos em 129 municípios do estado, pela técnica de quatro tamises, por 12 anos. Os autores observaram positividade de 27,86% de bovinos, 24,72% bubalinos, 16,92% ovinos e 15,66 caprinos para esse parasito.

Bellato et al., (2009), conduziram um estudo na população de bovinos nascidos e criados no município de Timbó - SC, no período de agosto de 2005 a julho de 2007. Foram coletadas amostras de fezes diretamente do reto de 160 bovinos, jovens e adultos, e observou-se que 18,12% (29/160) dos animais incluídos no estudo estavam positivos.

No estado do Paraná, Queiroz et al., (2002), realizaram levantamento sobre a presença de *F. hepatica* em 42 propriedades distribuídas nos municípios de Bocaiúva do Sul e Tunas do Paraná, durante o período de novembro de 1998 a fevereiro de 1999. Foi verificado após exame parasitológico de fezes realizado com rebanhos bovinos e ovinos das propriedades pesquisadas, a infecção em 4 (10 %) das propriedades, entretanto os autores não descrevem a taxa de infecção animal.

No estado de São Paulo, Oliveira et al., (1994) examinaram 90 amostras de fezes de búfalos originários do Município de Pariquera-Açu e verificaram que 17 (18,89%) foram positivas para ovos de *F. hepatica*.

Tostes et al., (2004), descrevem a partir da condenação de fígado de bovinos em matadouro, a ocorrência de fasciolose em uma propriedade na região de Presidente

Prudente. Durante o segundo semestre de 2001 e no decorrer de 2002, 120 mil animais foram abatidos, constatando-se 4.155 condenações de fígado pelo Serviço de Inspeção Federal nos frigoríficos da cidade. Deste total, 88 condenações foram decorrentes do parasitismo por *F. hepatica* o que correspondeu a 2,12% do total de lesões hepáticas catalogadas no período.

No estado do Rio de Janeiro, Pile et al., (2001), utilizando-se de exame de fezes, realizado pela técnica de Quatro Tamises, demonstrou-se a presença de ovos de *F. hepatica* em búfalos jovens e adultos procedentes do município de Maricá. Esse trabalho assinala o primeiro relato dessa parasitose na espécie bubalina no estado, registrando ocorrência de 2,5%, na amostra avaliada.

Gomes et al., (2002), relataram um foco da doença no município de Campos dos Goytacazes - RJ, onde foram encontrados bovinos e moluscos *Lymnaea* spp. naturalmente infectados em uma propriedade. Foram observadas taxas de 15,83% e de 5,22% de positividade respectivamente.

No estado do Espírito Santo, Carneiro et al., (2010), relatam a ocorrência de *F. hepatica* em búfalos, em uma propriedade de Jerônimo Monteiro, no sul do estado. Um total de 15 amostras de fezes foram coletadas e dessas, sete (46,67%) foram positivas para ovos de *F. hepatica*.

No sul desse estado, Alves et al., (2011), relataram a distribuição e fatores associados à infecção pelo parasito em bovinos. Os autores realizaram coletas de amostras fecais em cinquenta propriedades entre os anos de 2008 e 2009 em dez municípios da região e observaram que das 717 amostras analisadas, 154 (21,33%) estavam positivas para ovos de *F. hepatica*. E com base nos dados de condenação de fígados bovinos, Bernardo et al. (2011), avaliaram as perdas econômicas e a porcentagem de condenação devido a fasciolose. Analisando os dados oriundo de um matadouro localizado no município de Atílio Vivácqua, observou-se que a prevalência de condenação aumentou consideravelmente, sendo de 15,24% em 2006, 23,93% em 2007, 28,57% em 2008 e de 28,24% em 2009, em um total de 110.956 bovinos abatidos nesse período.

Vieira et al., (2011), conduziram um estudo em abatedouro também no sul do estado, identificando as principais causas e as porcentagens de condenações de fígados no exame post mortem entre os anos de 2008 e 2010. O parasitismo por *F. hepatica* foi a principal causa de condenação da víscera, respondendo por 62,2% as condenações.

No estado de Minas Gerais, Caldas et al., (1995), em exames coproparasitológicos realizados em bovinos provenientes de 51 municípios do estado, constataram índices de

animais positivos para as seguintes microrregiões: Belo Horizonte (1,80%), Itabira (0,6%), Divinópolis (1,3%), Poços de Caldas (0,26%), Varginha (0,51%) e Itajubá (9,05%).

Faria et al., (2005), demonstraram uma prevalência de 10,59% de positividade em 1.058 bovinos analisados no município de Itajubá. Os autores relatam ser esse um município considerado como enzoótico para a parasitose no estado.

Lima et al., (2009), em levantamento epidemiológico da ocorrência e a dispersão da *F. hepatica* no estado, coletaram amostras de fezes de bovinos com idade superior a 12 meses, provenientes de 1.251 propriedades rurais de 120 municípios de Minas Gerais, no período de abril de 2005 a abril de 2006. Em 16 municípios, dentre os estudados, foi relatada a presença de bovinos infectados por *F. hepatica*.

Bennema et al., (2014) utilizaram dados georreferenciados da prevalência de *F. hepatica* em bovinos abatidos em 1.032 municípios do país onde fígados foram condenados por causa do parasito pelo Serviço de Inspeção Federal (MAPA/SIF). Em onze estados foram observados ao menos um animal infectado: Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Pará, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. Entretanto a prevalência mais alta da fasciolose foi observada nos estados do Sul, com presença de focos da doença ao longo do litoral do Paraná e Santa Catarina e no Rio Grande do Sul.

2.6 Epidemiologia

A ocorrência, dispersão e prevalência da *F. hepatica* está diretamente associada à fatores ecológicos de cada região, como características ambientais, climáticas e topográficas, presença de hospedeiros vertebrados e invertebrados susceptíveis a infecção, e de fatores antrópicos, relacionados com o manejo dos rebanhos bem como a comercialização de animais parasitados para áreas livres de infecção (Silva et al., 1980; Gaasenbeek et al., 1992,; Serra-Freire, 1995; Mattos et al., 1997, Oliveira, 2008).

A presença dos hospedeiros intermediários, moluscos limnéideos, é um fator indispensável para a ocorrência do ciclo da parasitose. Como já descrito, esses moluscos podem ser encontrados em locais alagadiços, geralmente com águas lentas e pouca correnteza. A temperatura, umidade e pluviosidade têm relação direta com a sobrevivência e desenvolvimento das populações de moluscos, e conseqüentemente do parasito, visto que esses se desenvolvem melhor em temperaturas variando entre 10 a

25°C e com bastante umidade. A população de moluscos, em geral, aumenta durante as estações chuvosas e diminui após os períodos de estiagem e frio. Nos períodos em que as condições climáticas são desfavoráveis os moluscos podem sobreviver, entrando em estivação ou enterrando-se na lama ou barro e assim permanecer por vários meses (Silva et al., 1980; Serra-Freire e Nuernberg 1992; Mattos et al., 1997).

Nas estações chuvosas os locais de ocorrência desses moluscos podem ser ampliados para outras regiões, pois estes podem ser carregados pelas águas facilitando a formação de novos criadouros, uma vez que apresentam grande capacidade de colonizar novos habitats quando introduzidas naturalmente ou artificialmente no ambiente (Silva et al., 1980; Serra-Freire, 1999). Se os moluscos carregados estiverem infectados por *F. hepatica*, um novo foco da parasitose pode se instalar em regiões antes livres do parasito.

A presença de moluscos em locais onde os hospedeiros vertebrados costumam pastear e se alimentar também está associada a doença. Locais de várzea e áreas alagadiças em meio as pastagens, criam um ambiente favorável ao desenvolvimento do ciclo visto que facilitam o contato parasito-hospedeiro. Uma vez infectado, os hospedeiros vertebrados defecam nessas áreas inundadas e facilitam o encontro do ovo com a água, onde esse se desenvolve e origina o miracídio. O miracídio encontra então os moluscos ali presentes, e esses infectados vão liberar metacercárias, contaminando o pasto e promovendo a infecção dos vertebrados (Boray, 1969; Oliveira et al., 1994; Abílio e Watanabe, 1998).

O destino dado às fezes de animais infectados, também pode facilitar esse encontro parasito-hospedeiro. Se as fezes do curral são lavadas para fontes de água onde ocorrem os moluscos, o parasito estará em condições favoráveis ao seu desenvolvimento. Araújo et al., (1995) citam ainda a contaminação dos cursos de água por frigoríficos e abatedouros que descartam de forma inadequada vísceras de animais contaminados.

O tipo de manejo utilizado na criação, que coloca animais a pasto por longos períodos e o consórcio de pastejo com outras espécies também são importantes na manutenção da fasciolose (Cunha et al., 2007; Bernardo, 2009). A comercialização sem a devida fiscalização e condições sanitárias adequadas de animais infectados para áreas livres da infecção, mas com condições ambientais favoráveis a ocorrência do ciclo natural do parasito também favorece a infecção (Lima et al., 2009; Dracz & Lima 2014).

Além desses fatores, a falta de conhecimento sobre o parasito por parte dos produtores é outro ponto importante, pois leva a um tratamento inadequado do rebanho

resultando em medidas falhas de controle e profilaxia, e falta de notificação de novos casos, o que poderia contribuir em estudos epidemiológicos.

2.7 Interação parasito-hospedeiro

As infecções por helmintoseas respostas imunológicas do hospedeiro correspondentes são produtos de uma co-evolução dinâmica prolongada entre o hospedeiro e o parasito (Anthony et al., 2007).

Apesar da capacidade de induzir resposta imune, *F. hepatica* consegue estabelecer e manter infecções crônicas, o que reflete o sucesso do parasito à evasão da resposta imune do hospedeiro vertebrado. Essa capacidade depende de uma série de adaptações que permitem evitar ou resistir a um ataque do sistema imunológico.

Durante o desenvolvimento, esse trematódeo altera continuamente a produção e liberação de antígenos de excreção e secreção, como uma forma de escape ao sistema imune, “prevenido” o ataque de granulócitos em resposta aos anticorpos produzidos (Keegan & Trudgett, 1992).

As alterações celulares e tissulares, que acompanham o desenvolvimento da infecção, encontram-se associadas também à susceptibilidade da espécie de hospedeiro vertebrado e às características bioquímicas do parasito durante os diferentes estágios de desenvolvimento o que resulta em alterações patológicas e imunológicas que variam consideravelmente de hospedeiro para hospedeiro (Boray, 1969; Zhang et al., 2005).

Nas infecções por *F. hepatica*, os mecanismos envolvidos nas respostas do hospedeiro e estratégias de sobrevivência do parasito mostram-se complexos. Sabe-se que a resposta inicial nas primeiras semanas de infecção é do tipo Th1, caracterizada por elevados níveis de INF- γ , IL-2 e alta capacidade de proliferação de linfócitos no sangue periférico, e essa resposta pode atuar no combate ao parasito durante a migração pela cavidade peritoneal e pelo parênquima hepático (Oldhan & Willians 1985; Clery & Mulcahy 1998; Pleasance et al., 2011).

Esse período de migração pela cavidade peritoneal e pelo parênquima hepático é conhecido como fase aguda da infecção. Os vermes imaturos possuem no seu tegumento espinhos e uma variedade de compostos antigênicos. Estes permitem aos vermes imaturos atravessar as paredes do intestino delgado, alcançar a cavidade peritoneal, romper a cápsula hepática e migrar pelo parênquima, ocasionando a destruição de células do tecido,

os hepatócitos, eritrócitos e linfócitos, formando um homogenado do qual se alimentam (Dawes, 1963).

Nas migrações dos parasitos imaturos pelo fígado, ocorrem lesões no parênquima hepático, veias e ductos biliares, causando hemorragia, trombose e alterações no fluxo biliar. As lesões comprometem a integridade funcional do fígado e aumentam proporcionalmente ao desenvolvimento do parasito e suscetibilidade do hospedeiro. Esses danos causados ao tecido estimulam intensa reação inflamatória celular, com a presença de linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e restos de tecidos e células. Aos poucos no local das áreas lesionadas, forma-se um tecido fibroso ou cicatricial, caracterizando fibrose (Dawes, 1963; Boray, 1969; Ross et al., 1966).

Quando os parasitos alcançam os ductos biliares, atingem a maturidade sexual e ocorre a postura de ovos, inicia-se a fase crônica da infecção. A sobrevivência do parasito no hospedeiro está associada ao desenvolvimento de uma resposta Th2, caracterizada por diminuição da produção de IFN- γ , da capacidade proliferativa de linfócitos no sangue periférico e aumento na produção de IL-4, IL-10 e IgG1 (Clery et al., 1996; Flynn & Mulcahy, 2008).

Sabe-se que no geral, as respostas do tipo Th2 contra helmintos, podem resultar na eliminação do parasito e garantir uma resistência a novas infecções, ou levar a uma infecção crônica, como é o caso da fasciolose, onde a resposta Th2, não oferece proteção ao hospedeiro, favorecendo a sobrevivência do parasito (Clery & Mulcahy 1998).

Após a penetração dos parasitos nos ductos biliares o parênquima se recupera e a inflamação passa a ser restrita a parede dos ductos e áreas do parênquima imediatamente adjacentes. Nesse local os parasitos se alimentam de sangue e causam lesões mecânicas, espessamento do epitélio dos ductos biliares e pode ocorrer também uma reação granulomatosa levando à mineralização. Nas lesões podem ser observados infiltrados inflamatórios de eosinófilos, linfócitos e macrófagos (Dawes, 1963; Thorpe, 1965; Berne, 1994; Martínez-Moreno et al., 1997).

Em situações a campo, os animais estão em constante contato com o parasito, resultando em sinais de fase aguda e crônica associados.

2.8 Diagnóstico

Dentre as técnicas diretas, as mais comuns e utilizadas são as coproparasitológicas, que permitem a visualização de ovos do parasito. Das técnicas mais conhecidas destacam-se as de Watanabe et al., (1953), de Dennis et al., (1954), de Girão e Ueno (1985) e a de filtração sequencial em dois tamises metálicos em aparelho de Flukefinder (Faria et al., 2008).

Alguns fatores que podem influenciar a eficiência dessas técnicas coproparasitológicas são a baixa sensibilidade de alguns exames, a inexperiência para se realizar a leitura dos exames, a baixa carga parasitária nos animais infectados que pode resultar em poucos ovos liberados nas fezes. Um ponto negativo é que permitir que a parasitose seja diagnosticada apenas após o parasito ter migrado pelo parênquima hepático e ter completado o ciclo no hospedeiro. Outra técnica de diagnóstico mais simples é o encontro de parasitos adultos nos ductos biliares de animais mediante necropsia e inspeção pós morte.

As técnicas indiretas foram desenvolvidas a partir dos anos 90 e são capazes de detectar anticorpos produzidos contra qualquer fase do parasito bem como antígenos que o próprio parasito produz e secreta. As técnicas de pesquisa de anticorpos mais utilizadas são imunofluorescência indireta, imunoelectrotransferência (EITB) e a técnica de diagnóstico imunoenzimático ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), sendo essa última uma das mais utilizadas. A pesquisa de anticorpos no soro sanguíneo pela técnica de ELISA indireta, embora indique se o animal teve contato com o parasito, não permite saber com certeza se a infecção está em curso ou se já foi debelada. Entretanto, em animais acompanhados sorologicamente, permite a detecção da infecção ainda no período pré-patente (Kleiman et al., 2005; Valero et al., 2012).

Outras vantagens dessas técnicas indiretas são a capacidade de diagnóstico em estágio inicial da infecção, além de alta sensibilidade, especificidade e rapidez, e a possibilidade de se estudar grandes populações em um curto prazo.

Além dos exames já citados, pode-se também utilizar exames hematológicos para avaliar a resposta das células circulantes de defesa do organismo e para avaliar os níveis séricos de enzimas liberadas por células hepáticas lesionadas (Urquhart, 1996).

3. JUSTIFICATIVA

A fasciolose é uma zoonose que apresenta importância em medicina humana e veterinária e causa prejuízos econômicos graves à pecuária mundial em animais de interesse econômico, como bovinos, bubalinos e ovinos.

Encontra-se em expansão no estado de Minas Gerais, e novos focos da doença vem sendo descritos em regiões antes consideradas indenes. A busca por novas regiões de dispersão do parasito com infecções naturais de hospedeiros vertebrados e invertebrados, contribui para melhor entendimento dos fatores de risco associados a ocorrência e manutenção do ciclo desse trematódeo.

Em um estudo prévio realizado na região metropolitana de Belo Horizonte, constatou-se em abatedouro a condenação de fígados bovinos infectados por *F. hepatica* proveniente dos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa. Esses municípios apresentam grande atividade pecuária e um intenso comércio desses animais entre os produtores do próprio município como também para municípios vizinhos. Além da região apresentar características topográficas, hidrográficas e climáticas propícias para o estabelecimento e manutenção do ciclo biológico.

O conhecimento de fatores epidemiológicos relacionados a esse parasito é importante para o desenvolvimento de estratégias de controle efetivas para cada região. Assim como o conhecimento da relação que a *F. hepatica* estabelece com seus hospedeiros também são de grande importância para melhor controle da doença.

Os mecanismos envolvidos na resposta imune celular e humoral do hospedeiro frente a infecção por *F. hepática* mostram-se complexos e ainda pouco esclarecidos, principalmente em ovinos, animais que não apresentam resistência ao parasito e podem vir a óbito ainda na fase aguda da infecção. Apesar da intensa resposta por parte do hospedeiro vertebrado o parasito utiliza-se de mecanismos de escape, conseguindo assim sobreviver e estabelecer uma infecção crônica. O entendimento desses mecanismos de evasão utilizados pela *F. hepatica* durante o curso da infecção no hospedeiro vertebrado, torna possível o esclarecimento de diferentes níveis da interação parasito-hospedeiro. Permitindo o estabelecimento de novas estratégias de controle da infecção e sugestão de mecanismos de proteção como uma linha de defesa adicional no controle da fasciolose.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Realizar nos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, levantamento de hospedeiros vertebrados e invertebrados naturalmente infectados por *Fasciola hepatica*, avaliando fatores associados à presença do parasito.

Realizar acompanhamento parasitológico, hematológico e imunológico de ovinos da raça Santa Inês experimentalmente infectados por *F. hepatica*, nas fases aguda e crônica da infecção.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a taxa de condenação de fígados e a taxa de infecção natural por *F. hepatica* em bovinos abatidos no município de Pedro Leopoldo.
- Descrever as lesões macroscópicas e histológicas nos fígados bovinos parasitados por *F. hepatica*.
- Avaliar por meio de inquérito coprológico, a ocorrência de *F. hepatica* em bovinos e bubalinos nos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa.
- Identificar fatores associados à transmissão da parasitose nesses municípios.
- Avaliar a ocorrência de *Lymnaea* spp. nos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, e a taxa de infecção natural por *F. hepatica* nesses moluscos.
- Avaliar, com infecção experimental, a susceptibilidade de ovinos da raça Santa Inês à *F. hepatica* e acompanhar parâmetros parasitológicos por meio da liberação de ovos do parasito nas fezes.
- Avaliar *in vitro*, nas fases aguda e crônica da infecção, a produção de TGF- β em culturas de células mononucleares do sangue periférico dos ovinos Santa Inês, estimuladas com antígenos bruto e antígeno de exceção e secreção de parasito.

- Avaliar *in vitro*, nas fases aguda e crônica da infecção, a produção de óxido nítrico em culturas de células mononucleares do sangue periférico dos ovinos experimentalmente infectados, estimuladas com antígenos bruto e antígeno de exceção e secreção de parasito.
- Avaliar a resposta humoral dos ovinos, na fase aguda e crônica da infecção, acompanhando os níveis séricos de anticorpos IgG específicos contra antígenos do parasito, no plasma desses animais.

CAPITULO 1

Causas de condenação e avaliação patológica de fígados infectados por *Fasciola hepatica* inspecionados em frigorífico da região central do Estado de Minas Gerais

1. Introdução

Minas Gerais é um dos principais estados produtores de leite e carne no Brasil. Apresenta um rebanho de 24,2 milhões de bovinos (IBGE, 2013). Entretanto, um dos principais fatores que interfere na exploração econômica do rebanho bovino são as endoparasitoses que podem provocar alta morbidade e mortalidade dos animais. Dentre elas encontra-se a fasciolose, doença causada por *Fasciola hepatica* que parasita o parênquima hepático e os ductos biliares de bovinos, bubalinos, ovinos e outros mamíferos (Lima et al. 2009).

A fasciolose é uma das principais causas de prejuízo econômico à pecuária devido a redução da produtividade em rebanhos, à queda na produção de leite, atraso no crescimento de animais, perda de peso, gastos no controle e tratamento dessa parasitose, além da condenação de fígados durante o abate de animais (Bostelmann et al. 2000; Dracz & Lima 2014).

No Brasil o parasito possui relatos de sua ocorrência em todas as regiões do país. No estado de Minas Gerais considera-se que a *F. hepatica* está em expansão, como pode ser observado em trabalhos que demonstram que os índices de condenação de fígados por fasciolose em abatedouros e novos casos de infecções em animais de regiões antes consideradas livres da parasitose vêm aumentando gradativamente nos últimos anos (Lima et al., 2009; Dracz & Lima, 2014; Bennema et al., 2014).

Considerando os fatores acima citados e o fato de que poucos trabalhos dessa natureza foram realizados no estado de Minas Gerais, o presente trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência de fasciolose em fígados de bovinos abatidos em matadouro sob o Serviço de Inspeção Estadual no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais. Foram também identificadas outras causas de condenação desse órgão e avaliou-se macro e microscopicamente as lesões provocadas pelo parasito nos fígados parasitados.

2. Material e Métodos

2.1 Coleta de dados

A pesquisa foi realizada a partir dos dados cedidos pelo IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária) sobre as condenações de fígados bovinos durante abate ocorridos entre janeiro de 2011 e dezembro de 2015 no matadouro FrigoVitor localizado no município de Pedro Leopoldo (19° 40' 10.43" de Latitude Sul, 44° 0' 59.93" de Longitude Oeste), fiscalizado pelo próprio IMA segundo as normas do RIISPOA.

Os bovinos abatidos foram provenientes de diferentes municípios pertencentes à região metropolitana de Belo Horizonte, mas principalmente do próprio município de Pedro Leopoldo.

2.2 Avaliação macroscópica e microscópica de fígados parasitados por *Fasciola hepatica*

Os fígados nos quais foram observadas a presença do parasito e ou lesões características do parasitismo por *F. hepatica*, foram acondicionados em sacos plásticos em caixas de isopor com gelo e encaminhados ao Laboratório de Helminologia Veterinária do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Foram realizadas avaliações macroscópicas em relação a coloração, consistência, forma, deposição de fibrina na superfície do órgão, presença de pontos de necrose e fibrose, espessamento da parede, mineralização, ectasia e obstrução dos ductos biliares.

Para avaliação histopatológica fragmentos de aproximadamente 2 cm dos fígados que apresentavam alterações foram retirados com auxílio de um bisturi e fixados em formol 10% tamponado e processados de acordo com técnica de rotina para inclusão em parafina (Luna, 1968). Após a fixação o material foi desidratado em álcool e diafanizado em xilol. Os fragmentos foram incluídos em parafina e realizados cortes de cinco micrômetros. As lâminas foram coradas pela Hematoxilina-Eosina e analisadas em microscópio de luz comum nas objetivas de 04, 10, 20, 40 e 100 X.

3. Resultados

3.1 Causas de condenação dos fígados

Observou-se que entre os anos de 2011 e 2015, 19.491 bovinos foram abatidos e inspecionados, e destes, 1.761 (9,03%) apresentaram lesões ou alterações hepáticas observadas na linha de inspeção (TABELA 1) tendo seus fígados condenados.

TABELA 1 - Valores totais e médias de bovinos abatidos, número de fígados condenados e o percentual de condenações nos anos de 2011 a 2015 em matadouro no município de Pedro Leopoldo – MG.

Ano	Número de bovinos abatidos	Número de fígados condenados	% de condenação
2011	4.690	369	7,87
2012	3.854	211	5,47
2013	3.815	330	8,65
2014	3.346	340	10,16
2015	3.786	511	16,50
Total	19.491	1.761	9,03
Média	3.898	352	9,73

Na Tabela 2, estão representados os dados relacionados à quantidade total de fígados condenados por ano, bem como a porcentagem de cada causa de condenação.

Dentre todas as condenações, observou se que as principais causas foram, em ordem decrescente: abscessos - 26,24% (462), cisticercose calcificada - 18,85% (332), teleangiectasia - 18,11% (319), esteatose - 11,64% (205), contaminação - 6,36% (112), hidatidose - 4,6% (81), hepatite - 3,98% (70), congestão - 3,18% (56), fasciolose - 3,01% (53), cirrose hepática - 1,99% (35), tuberculose - 0,97% (17), neoplasias - 0,57% (10), cisticercose viva - 0,28% (5), tuberculose caseosa e peri hepatite - 0,11% (2).

TABELA 2 - Número total de fígados bovinos condenados na linha de inspeção em matadouro no município de Pedro Leopoldo – MG, nos anos de 2011 a 2015, causas de condenações e suas respectivas porcentagens.

Causa	2011 Condenações / Porcentagem (%)	2012 Condenações / Porcentagem (%)	2013 Condenações / Porcentagem (%)	2014 Condenações / Porcentagem (%)	2015 Condenações / Porcentagem (%)
Abscessos	116 / 31,44%	91 / 43,13%	94 / 28,50%	77 / 22,65%	84 / 16,44%
Cirrose	2 / 0,54%	12 / 5,69%	5 / 1,50%	6 / 1,76%	10 / 1,96%
Cisticercose viva	2 / 0,54%	0 / 0,00%	1 / 0,30%	0 / 0,00%	2 / 0,39%
Cisticercose calcificada	15 / 4,07%	6 / 2,84%	85 / 25,70%	104 / 30,6%	122 / 23,87%
Congestão	19 / 5,15%	16 / 7,58%	6 / 1,80%	6 / 1,76%	9 / 1,76%
Contaminação	15 / 4,07%	25 / 11,85%	19 / 5,80%	22 / 6,47%	31 / 6,07%
Esteatose	64 / 17,34%	4 / 1,90%	47 / 14,20%	40 / 11,76%	50 / 9,78%
Fasciolose	22 / 5,96%	21 / 9,95%	2 / 0,60%	5 / 1,47%	3 / 0,59%
Hepatite	4 / 1,08%	0 / 0,00%	10 / 3,00%	13 / 3,82%	43 / 8,41%
Hidatidose	6 / 1,63%	1 / 0,00%	18 / 5,50%	19 / 5,59%	38 / 7,44%
Neoplasia	1 / 0,27%	2 / 0,00%	2 / 0,60%	3 / 0,88%	4 / 0,78%
Teleangiectasia	97 / 26,29%	35 / 16,59%	40 / 12,20%	41 / 12,06%	106 / 20,74%
Tuberculose calcificada	3 / 0,81%	1 / 0,47%	1 / 0,30%	4 / 1,18%	8 / 1,57%
Tuberculose caseosa	1 / 0,27%	0 / 0,00%	0 / 0,00%	0 / 0,00%	1 / 0,20%
Peri hepatite	2 / 0,54%	0 / 0,00%	0 / 0,00%	0 / 0,00%	0 / 0,00%
Total	369 / 100,00%	211 / 100,00%	330 / 100,00%	340 / 100,00%	511 / 100,00%

Observou-se que entre os anos de 2011 e 2012, o parasitismo por *Fasciola* era a quarta maior causa de condenação de fígados dos bovinos abatidos. Nos anos seguintes, observou-se redução no número de animais infectados, passando a ser a décima maior causa de condenação da víscera. Entretanto, levando em consideração todo o período estudado, a fasciolose foi a nona causa de condenação e a terceira parasitose mais prevalente que acometeu o fígado.

3.2 Avaliação macroscópica

Foram coletados seis fígados bovinos com infecção por *F. hepatica* comprovada pelo encontro de parasitos adultos nos ductos biliares e de lesões hepáticas características do parasitismo.

Observou-se que os fígados apresentaram perda da arquitetura do parênquima hepático caracterizada por depressão e lóbulos com bordas abauladas, deposição de fibrina, focos de necrose e de fibrose distribuídos na superfície do órgão, espessamento dos ductos biliares com acentuada calcificação e obstrução, presença de líquido de coloração amarelada e grânulos pretos no interior dos ductos (FIGURAS 1 e 2).

Em todos os fígados também foram recuperados parasitos adultos nos ductos biliares. Foram recuperados um total de 5, 14, 23, 42, 56 e 590 de exemplares de *F. hepatica*, com uma média de 121,6 parasitos por órgão.

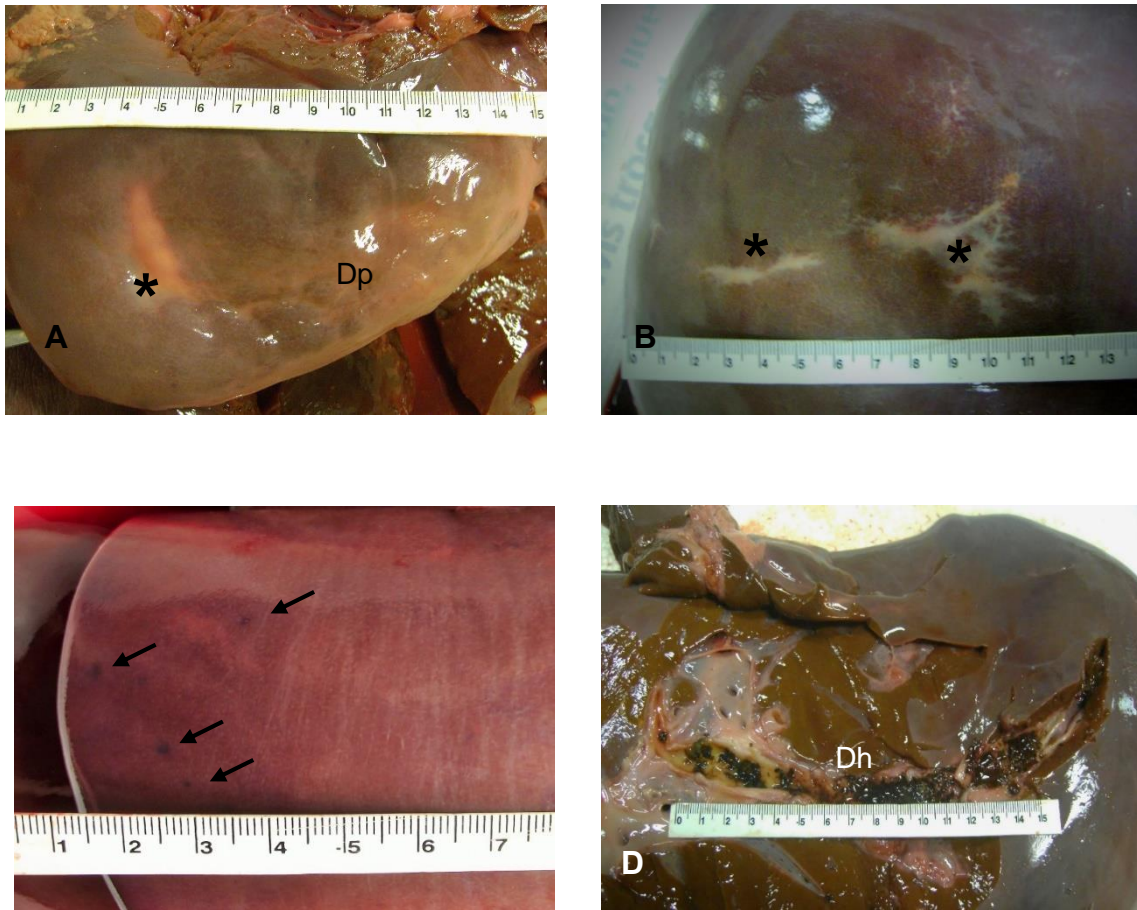


FIGURA 1 - Fígado de bovino naturalmente infectado por *Fasciola hepatica* proveniente do município de Pedro Leopoldo, MG, com lesões decorrentes da infecção. A) Depressão (Dp) e áreas de fibrose (asterisco) na capsula hepática. B) Áreas de fibrose (asterisco). C) Pontos de necrose (seta preta). D) Ducto hepático com intensa ectasia, espessamento e mineralização, contendo no lúmen material com grânulos pretos e secreção amarelada (Dh).

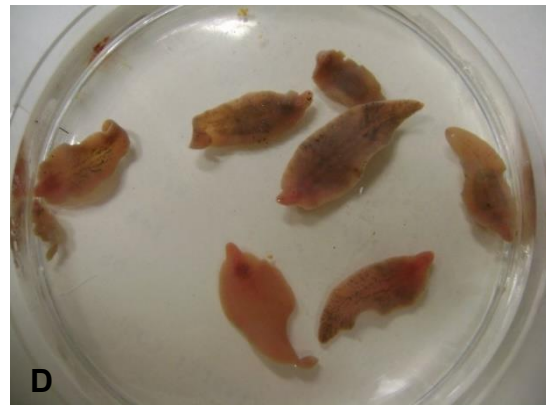
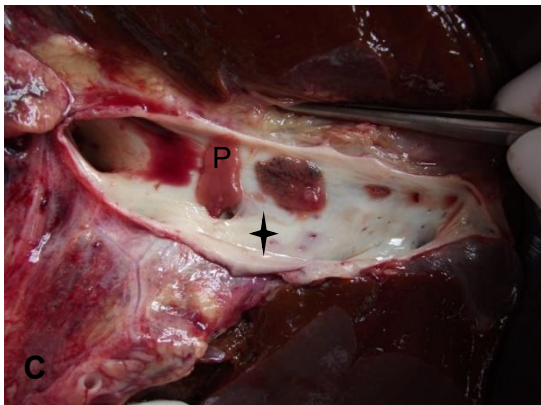
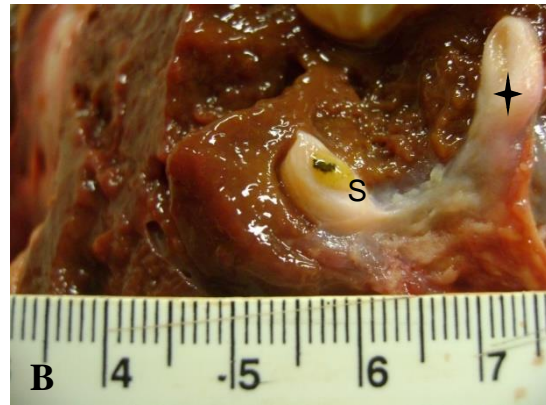
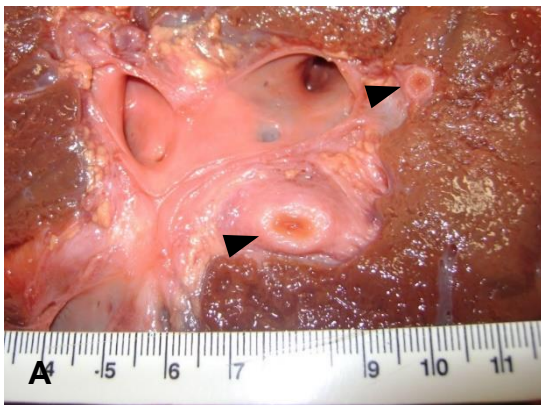


FIGURA 2 - Fígado de bovino naturalmente infectado por *Fasciola hepatica* proveniente do município de Pedro Leopoldo, MG, com lesões decorrentes da infecção. A) Ductos hepáticos com espessamento da parede e dilatação do lúmen (cabeça de seta). B) Ducto hepático com espessamento da parede (estrela) e no interior a presença de secreção amarelada contendo grânulos pretos (S). C) Parasitos adultos (P) no ducto biliar com ectasia do lúmen (estrela). D) Exemplos e *F. hepatica* coletados dos ductos biliares.

3.3 Avaliação microscópica

Os cortes histológicos foram analisados e as lesões provenientes do parasitismo documentadas em microscópio Olympus BX40 acoplado com câmera digital QColor 3™ (Olympus). Para capturar as imagens foi utilizado o software QCapture Suite™.

No fígado dos bovinos, havia infiltrado inflamatório multifocais e perivasculares, constituídos por células mononucleares. Foram caracterizadas áreas de fibrose no parênquima e em meio a ductos proliferados. Pode-se observar a deposição de fibras colágenas, em torno dos ductos biliares, e nas lesões decorrentes da migração do parasito pelo parênquima hepático. Também foram observadas dilatações e obstruções dos ductos hepáticos por material amorfo e restos celulares, e de ramo de artéria com trombo-embolo (FIGURAS 3 e 4).

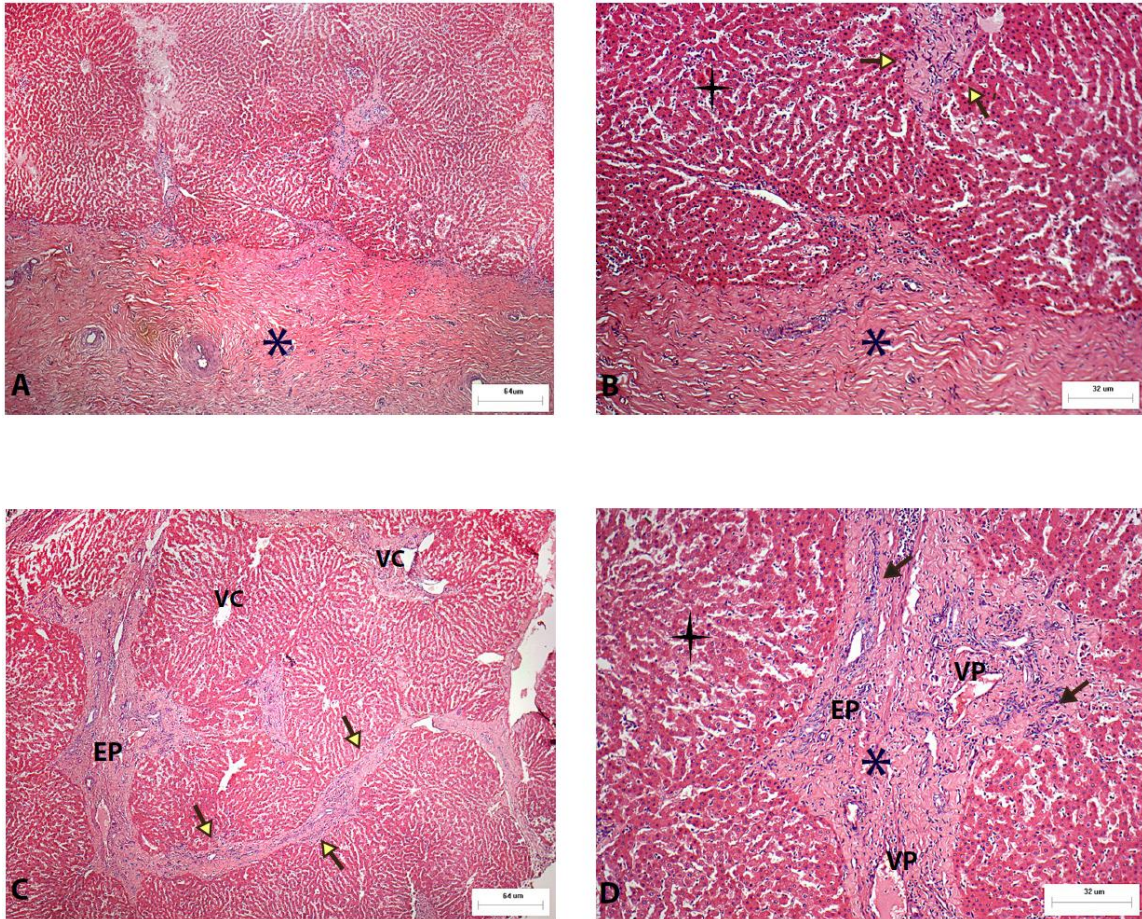


FIGURA 3 - Fígado de bovino naturalmente infectado por *Fasciola hepatica* proveniente do município de Pedro Leopoldo, MG. A) Intensa área de fibrose (asterisco). Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 10x; Barra= 64 micra). B) Maior aumento da imagem anterior. Fibroplasia (asterisco) formando feixes fibrosos que se coalescem caracterizando o “trajeto do parasito” (seta amarela) durante migração pelo parênquima hepático. Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 20x; Barra= 32 micra). C) Visão do espaço porta (EP), veia centrolobular (VC) e feixes fibrosos periportais que se interconectam caracterizando o “trajeto do parasito” (seta amarela). Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 10x; Barra= 64 micra). D) Detalhe do espaço porta (EP), com ramos da veia porta (VP) associada a moderada fibrose (asterisco) e infiltrado inflamatório (seta preta) na área periportal (estrela). Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 20x; Barra= 32 micra).

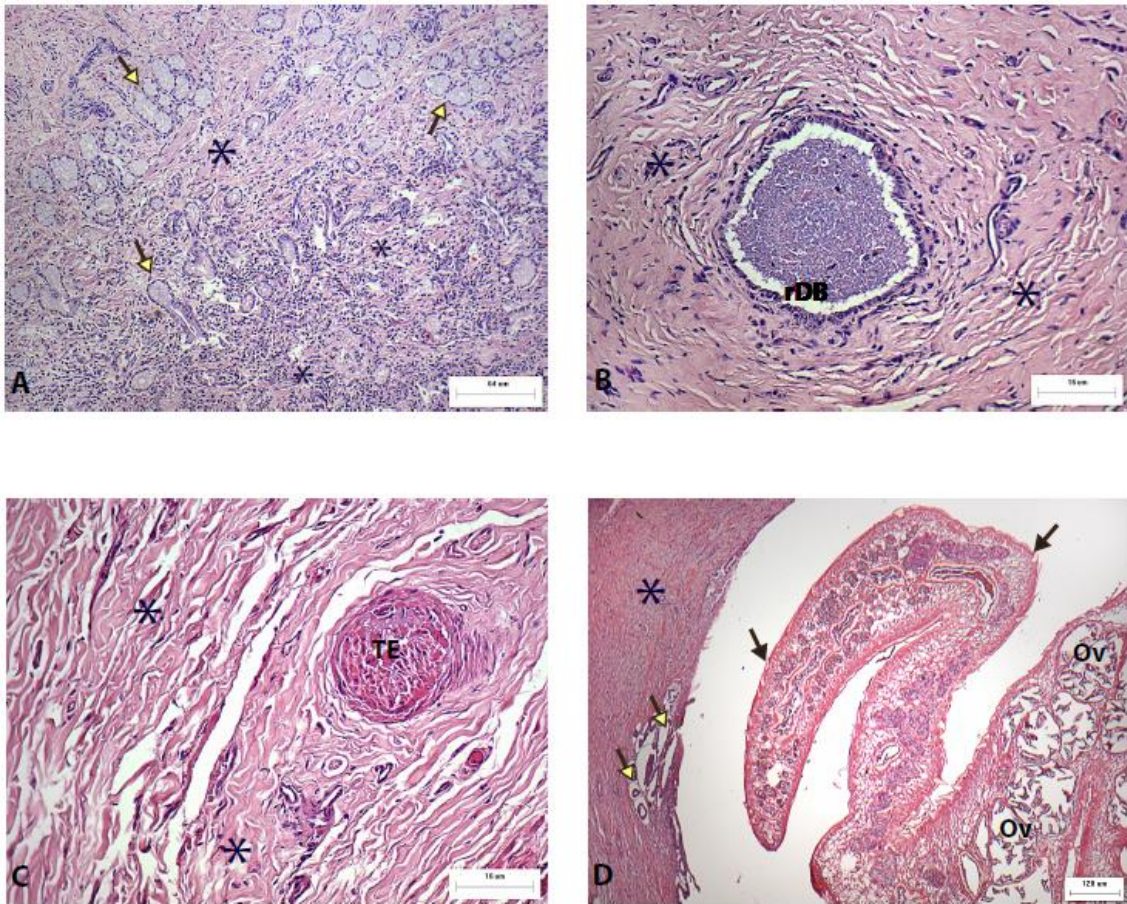


FIGURA 4 - Fígado de bovino naturalmente infectado por *Fasciola hepatica* proveniente do município de Pedro Leopoldo, MG. A) Intensa proliferação de ductos biliares (seta amarela) entremeados por fibroplasia (asterisco). Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 10x; Barra= 64 micra). B) Ectasia e fibrose periductal (asterisco) em torno de ramo de ducto biliar (rDB), no lúmen há restos celulares e material amorfo basofílico. Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 40x; Barra= 16 micra). C) Extensa área de fibrose (asterisco) e ramo de artéria com trombo-êmbolo (TE). Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 40x; Barra= 16 micra). D) Corte longitudinal do parasito. Pode-se observar o tegumento com espinhos (seta) e útero com presença de ovos (Ov). A parede do ducto está espessa devido a fibrose (asterisco) e há presença de remanescentes de epitélio biliar hiperplásico (seta amarela). Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 4x; Barra= 128 micra).

4. Discussão

A inspeção e condenação de órgãos, vísceras e carcaças de animais destinados ao abate, seja por apresentarem lesões e alterações decorrentes de processos patológicos ou mesmo infecções por parasitos, é importante para a saúde pública, pois tem o objetivo de tornar seguro o consumo humano desses alimentos (Herenda et al., 1994), uma vez que muitas das doenças dos animais, podem acometer os seres humanos, sendo consideradas zoonoses.

No presente trabalho, foram avaliados dados provenientes de 19.491 bovinos abatidos entre os anos de 2011 e 2015, em abatedouro municipal sob serviço de Inspeção Estadual. Dentre o número de bovinos abatidos, a porcentagem total de condenação de fígados no período foi de 9,03%.

Alguns autores encontraram maiores taxas de condenação dessa víscera em outros estados do país, como Santa Catarina - 31,75% (Mendes e Pilati, 2007) e Espírito Santo - 40,2% e 48,5% (Vieira et al., 2011).

As principais causas de condenação variaram pouco ao longo do tempo do estudo, sendo as três causas não parasitárias principais encontradas: abscessos (26,24%), teleangiectasia (18,11%) e esteatose (11,64%). E as parasitoses: cisticercose calcificada (18,85%), hidatidose (4,60%) e fasciolose (3,01%).

Resultados similares foram observados por alguns autores quando comparadas as causas de condenação nos estados do Rio Grande do Norte (Lima et al., 2007), Santa Catarina (Mendes e Pilati, 2007) e Espírito Santo (Baptista, 2008; Vieira et al., 2011).

Em relação as condenações exclusivas decorrentes do parasitismo por *F. hepatica*, observou-se no presente levantamento uma taxa de prevalência de 3,01% no município estudado, na região metropolitana de Belo Horizonte, valor menor quando comparado a outras regiões do país, principalmente nos estados do sul (Dultra et al., 2010; Bernardo et al., 2011; Tessele et al., 2013). Isso provavelmente pode ser explicado pelo fato dos outros autores terem avaliado regiões e municípios onde a fasciolose é considerada endêmica e apresenta elevadas taxas de infecção nos rebanhos

Entretanto a presença de animais parasitados nos municípios estudados no presente trabalho ressalta a importância de maiores estudos em áreas não consideradas endêmicas para a fasciolose, como os municípios de Pedro Leopoldo e municípios vizinhos, que apresentam condições epidemiológicas e antrópicas favoráveis a ocorrência do ciclo,

podendo vir a apresentar maiores taxas de infecção se não houver um controle adequado do parasito.

Escassos são os trabalhos realizados quando voltados a estudos epidemiológicos sobre *F. hepatica* e sua prevalência em ruminantes no estado de Minas Gerias, seja por métodos de observação de dados provenientes de frigoríficos-matadouros ou por inquéritos coproparasitológicos. Mas apesar de poucos, os relatos descritos, vem demonstrando cada vez mais novos focos de infecção autóctones, surgindo em áreas antes consideradas indenes (Lima et al., 2009, Dracz e Lima, 2014). Esse fato enfatiza cada vez mais a necessidade e importância de maiores estudos para se determinar e conhecer a real situação da dispersão do parasito no estado.

Além do levantamento da ocorrência de *F. hepatica* nos bovinos abatidos no município de Pedro Leopoldo, esse trabalho avaliou as lesões macro e microscópicas decorrentes do parasitismo nos fígados condenados.

Macroscopicamente, os fígados avaliados apresentaram depressão e pontos de necrose e fibrose na cápsula hepática, alterações na coloração apresentando-se mais pálidos e consistência mais friável. Ao início da dissecação do órgão foram observadas lesões nos principais ductos biliares como espessamento da parede, dilatação do lúmen, calcificação e obstrução. Alterações também observadas por outros autores (Bostelmann et al., 2000; Marcos et al., 2007; Adrien et al., 2013; Paula et al., 2014; Trivilin et al., 2014).

De acordo com os achados nos cortes histológicos, certificou-se que os animais estavam com fasciolose crônica, o que pode ser confirmado pela presença de parasitos adultos nos ductos, fibrose no parênquima hepático principalmente nos antigos trajetos de migração das formas imaturas do parasito, espessamento, obstrução e calcificação dos ductos biliares. Outros autores também observaram essas lesões em bovinos na fase crônica, seja em infecções naturais ou experimentais (Dow et al., 1967; Bostelmann et al., 2000; Marcos et al., 2007; Paula et al., 2014; Trivilin et al., 2014).

Outras observações como presença de infiltrado inflamatório com predominância de células mononucleares, fibrose periductal, periportal e perivascular, presença de ovos do parasito no interior de ductos, obstrução da luz dos ductos por restos celulares e trombose em pequenos vasos, foram observadas em todos os fígados analisados nesse estudo e esses resultados são semelhantes aos encontrados por outros autores em bovinos infectados por *F. hepatica* (Bostelmann et al., 2000; Marcos et al., 2007; Adrien et al., 2013; Paula et al., 2014; Trivilin et al., 2014).

A fibrose, observada nos fígados avaliados, também é descrita como uma das principais alterações nos quadros de fasciolose crônica, apesar de ser considerada como “uma solução” pós-necrótica que o organismo promove para tentar controlar a inflamação, é um processo que pode gerar danos como perda de função de parte do órgão uma vez que ocorre substituição do parênquima perdido. E o mecanismo de formação desse processo não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que esta correlacionado com a intensidade da infecção (Marcos et al., 2007; Trivilin et al., 2014). Dessa forma, é importante entender os eventos que levam a formação da fibrose a fim de identificar métodos terapêuticos que possam retardar ou interromper o seu processo de formação (Paula et al., 2014).

Com os dados obtidos, pode-se constatar que a *F. hepatica* está presente em municípios do estado de Minas Gerais antes considerados livres do parasito, com a confirmação de animais naturalmente infectados e concluir que as alterações histológicas observadas nos fígados desses bovinos promovem danos intensos aos tecidos, o que pode levar a significativas perdas economicas. E reforça a importancia da fiscalização adequada nos abatedouros para garantir que as visceras inadequadas para consumo humano não sejam comercializadas.

5. Referências bibliográficas

ADRIEIN M. L.; SCHILD A. L.; MARCOLONGO-PEREIRA C.; FISS L.; RUAS J. L.; GRECCO F. B.; RAFFI M. B. Acute fasciolosis in cattle in southern Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, 33(6): 705-709, 2013.

BAPTISTA A. T. Quantificações das Condenações em Vísceras de Bovinos em 2007 nos Matadouros-Frigoríficos do Estado do Espírito Santo registrados no serviço de inspeção estadual. Monografia (Pós-graduação "Lato Sensu") Universidade Castelo Branco, Instituto Brasileiro de Pós-Graduação Qualittas, 22p, 2008.

BENNEMA S. C.; SCHOLTE R. G. C.; MOLENTO M. B.; MEDEIROS C.; CARVALHO O. S. *Fasciola hepatica* in bovines in Brazil: data availability and spatial distribution. *Med. Trop. São Paulo*, 56(1): 35-41, 2014.

BERNARDO C. C.; CARNEIRO M. B.; AVELAR B. R.; DONATELE D. M.; MARTINS I. V. F.; PEREIRA M. J. S. Prevalence of liver condemnation due to bovine fasciolosis in Southern Espírito Santo: temporal distribution and economic losses. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal, 20(1): 49-53, 2011.

BOSTELMANN S. C. W.; LUZ E.; THOMAZ S. V.; CIRIO S. M. Histopatologia comparativa em fígados de bovinos, bubalinos e ovinos infectados por *Fasciola hepatica*. *Arch. Vet. Sci.*, 5: 95-100, 2000.

DOW C.; ROSS J. G.; TODD J. R. The pathology of experimental fasciolosis in calves. *J. Comp. Path.*, 77; 377-385, 1967.

DRACZ R. M.; LIMA W. S. Autochthonous infection of buffaloes and cattle by *Fasciola hepatica* in Minas Gerais, Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, Jaboticabal, 23(3): 413-416, 2014.

DUTRA L. H.; MOLENTO M. B.; NAUMANN C. R. C.; BIONDO A. W.; FORTES F. S.; SAVIO D.; MALONE J. B. Mapping risk of bovine fasciolosis in the south of Brazil using Geographic Information Systems. *Vet. Parasitol.*, 169: 76-81, 2010.

HERENDA, D.; CHAMBERS, P.G.; ETTRIQI, A. et al. Manual on meat inspection for developing countries. Roma, Itália: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 357p, 1994.

LIMA M. F. C.; SUASSUNA A. C. D.; AHID S. M. M.; FILGUEIRA K. D. Análise das alterações anatomopatológicas durante a inspeção post mortem em bovinos no abatedouro Frigorífico Industrial de Mossoró, Rio Grande do Norte. Ci. Anim. Bras., 17(2): 113-116, 2007.

LIMA W. S.; BARÇANTE J. M. P.; BARÇANTE T.A.; GUIMARÃES M. P.; SOARES L. R. M. Occurrence of *Fasciola hepatica* (LINNAEUS, 1758) infection in Brazilian cattle in the State of Minas Gerais. Rev. Bras. Parasitol. Vet., 18: 1-10, 2009.

LUNA, L. G. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 258 p, 1968.

MARCOS L. A.; YI P.; MACHICADO A.; ANDRADE R.; SAMALVIDES F.; SÁNCHEZ J.; TERASHIMA A. Hepatic fibrosis and *Fasciola hepatica* infection in cattle. J. Helminthol., 81(4): 381-386, 2007.

MENDES R. E.; PILATI C. Estudo morfológico de fígado de bovinos abatidos em frigoríficos industriais sob inspeção estadual no Oeste e no planalto de Santa Catarina, Brasil, Santa Catarina. Cienc. Rural.,37: 1728-1734, 2007.

PAULA F. M. A. B.; SOUZA D. R.; ARCHANJO A. B.; CARVALHO J. R.; NUNES L. C. Caracterização histológica de fígados bovinos com fasciolose crônica. Arc. Vet. Scienc., 19(4): 57-64, 2014.

TESSELE B.; BRUM J. S.; BARROS C. S. L. Lesões parasitárias encontradas em bovinos abatidos para consumo humano. Pesqui. Vet. Bras., 33(7): 873-889, 2013.

TRIVILIN L. O.; SOUSA D.R.; NUNES L.C.; ROCHA N.S.; MARTINS I. V.F.
Histopathology aspects and fibrosis evaluation of bovine naturally infected livers by
Fasciola hepatica. *Arc. Vet. Scienc.*, 19(1): 61-69, 2014.

VIEIRA N. P.; FARIA P. B.; MATTOS M. R.; PEREIRA A. A. Condenação de fígados
bovinos na região sul do estado do Espírito Santo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 63(6):
1605-1608, 2011.

CAPITULO 2

Fasciola hepatica em bovinos e bubalinos nos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, região central do estado de Minas Gerais

1. Introdução

Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758) é um trematódeo digenético da família Fasciolidae que parasita os ductos hepáticos de bovinos, bubalinos, ovinos, roedores e do homem (Lima et al. 2009). A fasciolose é considerada uma enfermidade de grande importância veterinária, pois representa um sério problema para a criação de ruminantes, ocasionando perdas econômicas decorrentes da queda na produtividade de carne, leite e lã, retardo no crescimento de animais jovens, abortos, mortalidade, rejeições de fígados em matadouros, além dos gastos no controle da parasitose (Lima et al., 2009; Dracz & Lima 2014).

Apresenta distribuição cosmopolita, sendo relatada na Europa, África, Ásia, Oceania e Américas. No Brasil, a região considerada enzoótica para o parasito são os estados do Sul (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná) e Sudeste (São Paulo, Rio de Janeiro, sul do Espírito Santo e de Minas Gerais) (Lima et al., 2009; Dracz & Lima, 2014; Bennema et al. 2014).

Em Minas Gérias considera-se que a ocorrência desse trematódeo está em expansão em várias regiões do estado, devido aos novos relatos que vem sendo descritos em áreas consideradas indenes (Lima et al., 2009; Dracz & Lima, 2014; Bennema et al., 2014).

O estado é um dos principais produtores de leite e carne no país, onde a agropecuária ocupa em torno de 70% do seu território. Segundo o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) em 2013, o número efetivo do rebanho bovino era de 24,2 milhões de bovinos, distribuídos principalmente no Triangulo Mineiro, Região Metropolitana e Vale do Aço.

Apesar do grande papel que o estado tem no campo da agropecuária nacional e da importância econômica do parasito, não há uma constância nas avaliações de ocorrência da fasciolose nos hospedeiros vertebrados, mesmo que alguns inquéritos parasitológicos indiquem a presença e dispersão da *F. hepatica* no território brasileiro (Oliveira, 2008).

A dispersão geográfica do parasito no Brasil se deve a transferência de animais de áreas onde a doença é enzoótica para localidades indenes com condições epidemiológicas favoráveis, como a presença de moluscos do gênero *Lymnaea*, que são os hospedeiros intermediários de *F. hepatica*, e fatores ambientais, climáticos e hidrográficos ideais que proporcionam condições para o desenvolvimento e estabelecimento do ciclo biológico (Lima et al., 2009; Alves et al., 2011; Martins et al., 2012; Dracz & Lima, 2014).

O conhecimento da dispersão do parasito, evidencia a importância e necessidade de estudos epidemiológicos identificando novos focos da doença para o real conhecimento da distribuição do parasito no estado de Minas Gerais. Além disso, identificar e conhecer fatores e aspectos de risco relacionados à sua disseminação e transmissão, para indicar medidas efetivas de controle adequadas a cada região.

2. Material e Métodos

2.1 Prevalência de *Fasciola hepatica* e fatores associados à infecção

2.1.1 Área de estudo

O município de Pedro Leopoldo está localizado nas coordenadas geográficas 19°37'12" de Latitude Sul, 44°2'38" de Longitude Oeste e apresenta uma extensão territorial de 292.947 km², fazendo divisa com o município de São Jose da Lapa, que está situado nas coordenadas geográficas 19° 70' 57.2" de Latitude Sul, 43° 97' 47.6" de Longitude Oeste e uma extensão territorial de 47.930 km².

A bacia do Rio das Velhas representa a principal rede hidrográfica da região, sendo seus principais afluentes os Ribeirões da Mata, das Neves e do Urubu em Pedro Leopoldo e o Córrego da Carranca e Ribeirão da Mata em São Jose da Lapa.

A topografia da região apresenta variações entre plana, ondulada e montanhosa, e a vegetação se insere na área de contato entre os biomas do cerrado e da Mata Atlântica. A vegetação original foi em grande parte substituída por pastagens, ocupação urbana, empresas que exploram recursos minerais (calcário, minério de ferro, argila e areia) e atividade industrial.

O clima dos municípios é considerado tropical úmido e seco de acordo com a classificação de Köppen, com um período de seca de maio a outubro e um período de chuvas de novembro a abril.



FIGURA 1 - Localização dos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa na região central do estado de Minas Gerais, Brasil. Fonte: IGA – Instituto de Geociências Aplicadas, 2015.

2.1.2 Determinação da prevalência de *Fasciola hepatica*

De acordo com o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) o rebanho bovino atual no município de Pedro Leopoldo é de 100 cabeças de bubalinos e 14.000 cabeças de bovinos, divididos em 120 propriedades. No município de São José da Lapa é de 30 cabeças de bubalinos e 1.500 de bovinos, divididos em 23 propriedades.

Para se determinar a ocorrência da parasitose na região, foi realizado o levantamento das propriedades rurais nesses municípios que possuíssem criação de rebanho bovino e bubalino e foram selecionadas aleatoriamente 50 propriedades do município de Pedro Leopoldo e 15 de São José da Lapa. Nessas propriedades foram realizadas coletas de fezes dos animais para pesquisa de ovos de *F. hepatica*.

2.1.3 Coletas e exame das fezes

Nas propriedades selecionadas, todos os animais com idade superior a 12 meses, foram contidos e foi realizada a coleta de amostras de fezes diretamente da ampola retal, com sacos plásticos devidamente identificados com o nome ou número do animal. As amostras foram acondicionadas em caixa de isopor com gelo e levadas ao Laboratório de Helminologia veterinária ICB/UFMG. O exame parasitológico das amostras fecais foi

realizado pela técnica dos Quatro Tamises segundo Girão & Ueno (1985), para a pesquisa de ovos de *F. hepatica*.

2.1.4 Técnica de Quatro Tamises Metálicos

Para o exame coprológico, foram pesados em copos plásticos, 10 gramas de cada amostra coletada. Adicionado 30 ml de água e homogeneizado com bastão de vidro até completa diluição das fezes. Em seguida, a mistura foi passada através de um conjunto de quatro tamises, dispostos uns sobre os outros, na sequência de ordem 100, 180, 200 e 250 malhas/polegadas. Os três primeiros tamises permitem a passagem de ovos de *F. hepatica*, retendo fibras fecais, conforme abertura das malhas, e o último tamis retém os ovos, juntamente com fibras fecais finas. A lavagem foi realizada em água corrente e o material retido no último tamis (250 malhas/polegada) foi recolhido em um copo plástico, utilizando um jato de água no sentido oposto ao da lavagem. Após dez minutos em decantação, foi retirado o sobrenadante com auxílio de uma pipeta de Pasteur, e o material decantado, transferido para uma placa de Petri e examinado ao microscópio estereoscópico no aumento de 40 vezes (Girão & Ueno, 1985).

2.1.5 Caracterização das propriedades

Em cada propriedade do estudo, foram colhidos dados de identificação e caracterização por meio de questionário (ANEXO 1) direcionado aos proprietários ou responsáveis e por meio de observação direta.

As informações referentes a identificação foram: nome do proprietário e da propriedade, localidade/bairro do município onde se encontra a propriedade, anotação das coordenadas geográficas (latitude e longitude) com o uso de um sistema de posicionamento por satélite - Sistema de Posicionamento Global – GPS (Garmin Nüvi 42), categoria animal amostrada, raça e número de amostras coletadas.

As informações de caracterização foram: tipos de exploração pecuária, tipo do sistema de produção, origem dos animais do rebanho, localização das pastagens, destino final das fezes do curral, origem da água oferecida aos animais, conhecimento de *F. hepatica* e compartilhamento do espaço com outras espécies animais.

As informações de observação direta foram: nível de tecnificação, distância das pastagens e a fonte de água natural quando presente, tipo de topografia das pastagens, presença de moluscos do gênero *Lymnaea* e local de observação dos moluscos.

Em relação ao nível de tecnificação das propriedades foram estabelecidos os seguintes parâmetros: Nível alto: considerado quando a propriedade apresenta uma infraestrutura moderna, incluindo ordenha mecânica, currais cobertos e com calçamento e limpeza diária das fezes. Nível médio: quando há uma infraestrutura, porém, mais simples, ordenha manual, currais com calçamento e limpeza diária ou periódica das fezes. Nível baixo: quando os animais são criados soltos ou há a existência de currais precários sem muita preocupação com a higiene do local.

2.1.6 Variáveis do estudo

Trata-se de um trabalho epidemiológico, de delineamento transversal. As variáveis foram obtidas com base no questionário aplicado aos produtores e responsáveis pelas propriedades (ANEXO 1).

2.1.6.1 Variável dependente

A variável dependente do estudo foi a presença da infecção por *F. hepatica* no rebanho nas propriedades estudadas (SIM/NÃO).

2.1.6.2 Variáveis independentes

As variáveis independentes utilizadas para a identificação dos fatores associados à infecção por *F. hepatica* foram:

- Relacionados ao ambiente: localização da área das pastagens, distância das pastagens à fonte de água natural presente, tipo de topografia do terreno e presença do molusco *Lymnaea* spp..

- Relacionados ao manejo do rebanho: origem dos animais do rebanho, tipo de exploração pecuária, tipo de produção, destino final das fezes do curral, origem da água oferecida ao rebanho, compartilhamento do pasto com outras espécies de animais,

conhecimento do produtor sobre o parasito e nível de tecnificação do sistema de produção.

2.1.7 Analise dos dados

Foi realizada uma análise descritiva dos dados, apresentando a ocorrência de *F. hepatica* nos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa e a caracterização das propriedades estudadas.

Em seguida, as possíveis relações entre a variável dependente e as variáveis independentes foram examinadas por meio de análises uni variadas usando o teste Qui-quadrado de Pearson. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$). Para avaliar a força de associação entre os fatores associados à transmissão e ocorrência da infecção por *F. hepatica* nos animais estudados, estimou-se a Odds Ratio (OR) para as variáveis independentes.

Realizou-se regressão logística uni variada, para avaliar a existência de associação entre a variável dependente e as variáveis independentes consideradas no estudo. Para cada uma das variáveis de interesse ajustou-se um modelo logístico onde todas as variáveis independentes com significância inferior a 0,20 ($p < 0,20$) nos modelos uni variados foram selecionadas para inclusão no modelo multivariado. Depois de selecionadas, as variáveis independentes foram incluídas uma a uma no modelo, realizando o processo passo a passo, sendo testada a entrada de cada uma delas em relação ao valor de “p” do modelo e das variáveis. Assim, somente as variáveis com o nível de significância estabelecido para o valor de “p” $< 0,05$ permaneceram no modelo.

Aquelas variáveis que apresentaram percentuais de 100% de casos confirmados não foram utilizadas no modelo por não permitir estimar a força de associação. Essas foram utilizadas apenas na parte descritiva do trabalho.

O ajuste global do modelo final foi verificado através do teste de HosmerLemeshow, sendo considerado adequado o modelo se o valor de “p” do teste for maior que 0,05. Os dados foram analisados, utilizando-se o programa “Statistical Package for Social Science” – SPSS versão 15.0 e o pacote estatístico Statistical Software for Professional (STATA) versão 12.0

2.2 Avaliação da viabilidade dos ovos e miracídios

Depois de contados, os ovos foram transferidos para placas de petri com água desclorada e mantidos em estufa a 27°C para incubação por um período de 8 - 14 dias para desenvolvimento e formação dos miracídios. Após o oitavo dia as placas contendo ovos com miracídios formados foram colocadas, diariamente, sob foco de luz (60W) a uma distância de 50 cm, por um período de uma hora, para estimular a eclosão destes.

Os miracídios eclodidos foram recolhidos com o auxílio de uma pipeta capilar e utilizados na infecção dos moluscos *L. columella* criados no laboratório. A infecção foi realizada utilizando-se placas de cultura de 24 poços (Kartel S.P.A). Os moluscos, com tamanho entre 4 e 6 mm, foram individualmente colocados nos poços contendo 2 ml de água desclorada e dois miracídios. Assim foram mantidos nas placas de cultura por um período de 24 horas sob foco de luz de 60 W a uma distância de 50 cm. Em seguida foram transferidos para cubas de plástico, medindo 30x20 cm, com 1 litro de água desclorada e folhas de alface para alimentação. As cubas foram limpas e os caramujos alimentados semanalmente. Aos cinquenta dias após a infecção, os moluscos foram retirados das cubas e colocados individualmente em placas de petri. As placas onde foram colocados os caramujos, foram forradas com filme plástico (Parafilm®, Laboratory Film – American National Can™) para facilitar o encistamento e a recuperação das metacercárias. As placas foram expostas a um foco de luz de 60 W a uma distância de 50 cm por 5 horas por dia para estimular a eliminação de cercárias.

Ao emergir do caramujo, as cercárias nadam ativamente e perdem sua cauda, encistando nas laterais e fundo da placa de petri, ou mesmo sob a concha do molusco. As metacercárias, foram então coletadas com auxílio de pipeta de Pasteur, quantificadas e armazenadas em tubos falcon de 15 ml com água desclorada em geladeira a 4°C.

2.3 Coleta de *Lymnaea* spp. e avaliação da infecção natural por *Fasciola hepatica*

Nas propriedades onde foram coletadas amostras fecais de bovinos e bubalinos, foram realizadas buscas e coletas de *Lymnaea* spp.. Ao longo das coleções de água foram realizadas conchadas utilizando-se uma peneira formada por malha de aço com 1 mm de largura e diâmetro de 35 cm. Também foi realizada uma busca manual pelos moluscos em plantas aquáticas quando presentes e no bebedouro.

Os moluscos coletados foram acondicionados em potes plásticos com água do próprio local de coleta e transportados ao Laboratório de Helminologia Veterinária do ICB/UFMG. Após triagem, dois a três exemplares dos moluscos de cada propriedade foram enviados ao Laboratório de Helminologia e Malacologia Médica, Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte – MG para identificação da espécie (ANEXO 2).

Para avaliar a infecção natural por trematódeos, os moluscos foram comprimidos individualmente em placa de petri, com bastão de vidro, os fragmentos de concha retirados e as partes moles dos moluscos dissecados com auxílio de estilete para verificar a presença de estágios larvais de *F. hepatica*.

3. Resultados

3.1 Prevalência de *Fasciola hepatica* e fatores associados à infecção

3.1.1 Prevalência de *Fasciola hepatica* nos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa

Foram visitadas nos dois municípios, 65 propriedades rurais nas quais haviam criação de bovinos e bubalinos. Nessas propriedades foram coletadas um total de 3.440 amostras, sendo 3.366 de bovinos e 74 de bubalinos.

No município de Pedro Leopoldo, foram visitadas 50 propriedades onde foram coletadas 2.689 amostras de fezes de bovinos e 55 amostras de fezes de bubalinos.

Constatou-se 83 bovinos e 2 bubalinos infectados, 3,1% e 3,6% de positividade respectivamente nos animais estudados. A porcentagem de animais positivos nas propriedades variou de 0 a 54,5% entre os bovinos e de 3,4 a 3,8% entre os bubalinos (TABELA 1).

TABELA 1 - Número total de amostras de fezes coletadas de bovinos e bubalinos nas propriedades visitadas no município de Pedro Leopoldo, MG, número de amostras positivas para ovos de *Fasciola hepatica* e porcentagem de positividade em cada propriedade.

Propriedade	Espécie amostrada	Total de amostras coletadas	Total de amostras positivas	% de animais positivos
1	Bovino	48	3	6,3%
	Bubalino	26	1	3,8%
2	Bovino	45	7	15,6%
3	Bovino	7	2	28,6%
4	Bovino	45	6	13,3%
5	Bovino	24	10	41,7%
6	Bovino	74	0	0,0%
7	Bubalino	29	1	3,4%
8	Bovino	22	12	54,5%
9	Bovino	30	0	0,0%
10	Bovino	123	0	0,0%
11	Bovino	99	0	0,0%
12	Bovino	279	0	0,0%
13	Bovino	111	0	0,0%
14	Bovino	62	6	9,7%
15	Bovino	37	5	13,5%
16	Bovino	44	6	13,6%
17	Bovino	52	3	5,8%
18	Bovino	89	0	0,0%
19	Bovino	41	2	4,9%
20	Bovino	58	0	0,0%
21	Bovino	105	0	0,0%
22	Bovino	72	2	2,8%
23	Bovino	35	0	0,0%
24	Bovino	71	0	0,0%
25	Bovino	69	1	1,4%
26	Bovino	38	3	7,9%
27	Bovino	18	0	0,0%
28	Bovino	54	0	0,0%
29	Bovino	79	0	0,0%
30	Bovino	34	0	0,0%
31	Bovino	87	0	0,0%
32	Bovino	35	0	0,0%
33	Bovino	18	0	0,0%
34	Bovino	27	0	0,0%

35	Bovino	20	0	0,0%
36	Bovino	83	7	8,4%
37	Bovino	29	1	3,4%
38	Bovino	72	4	5,5%
39	Bovino	49	2	4,1%
40	Bovino	37	0	0,0%
41	Bovino	52	0	0,0%
42	Bovino	44	0	0,0%
43	Bovino	41	0	0,0%
44	Bovino	15	1	6,7%
45	Bovino	34	0	0,0%
46	Bovino	50	0	0,0%
47	Bovino	27	0	0,0%
48	Bovino	22	0	0,0%
49	Bovino	35	0	0,0%
50	Bovino	47	0	0,0%

Com base nos dados georreferenciados obtidos com o GPS, foram elaborados mapas com o objetivo de fornecer uma melhor visualização da distribuição das propriedades pesquisadas no município de Pedro Leopoldo (FIGURAS 2 e 3).

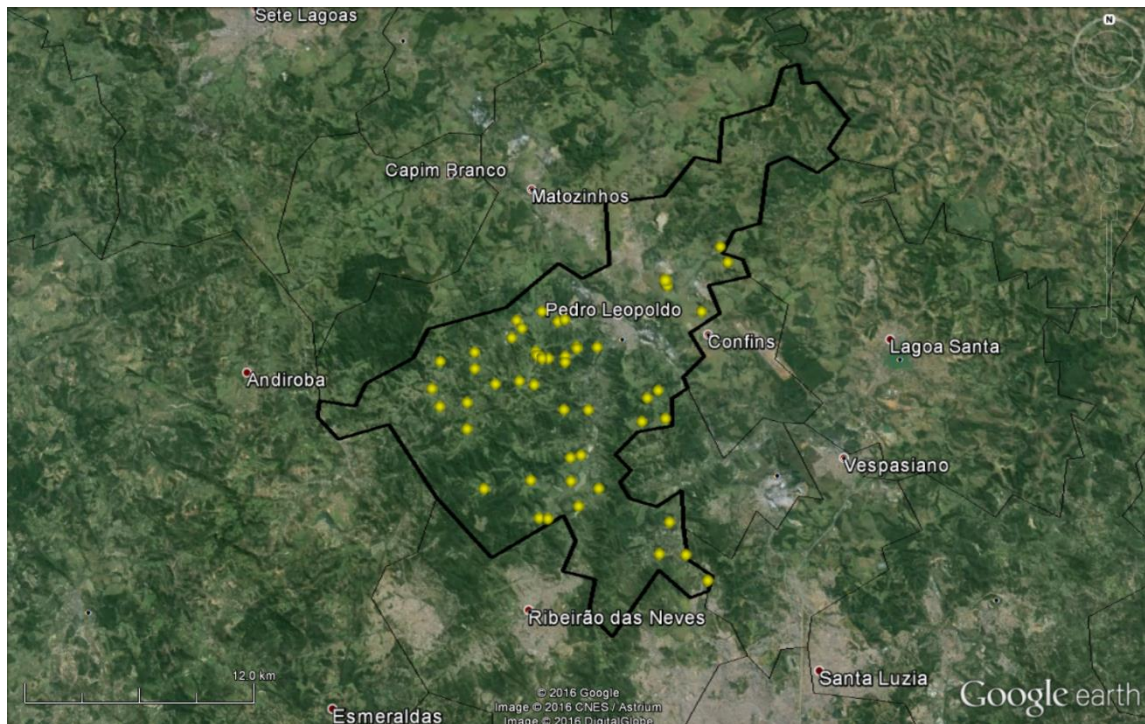


FIGURA 2 - Mapa de dados georreferenciados mostrando a localização das propriedades rurais onde foram realizadas buscas por bovinos e bubalinos naturalmente infectados por *Fasciola hepatica* no município de Pedro Leopoldo, MG.

Legenda: ● Propriedades rurais visitadas

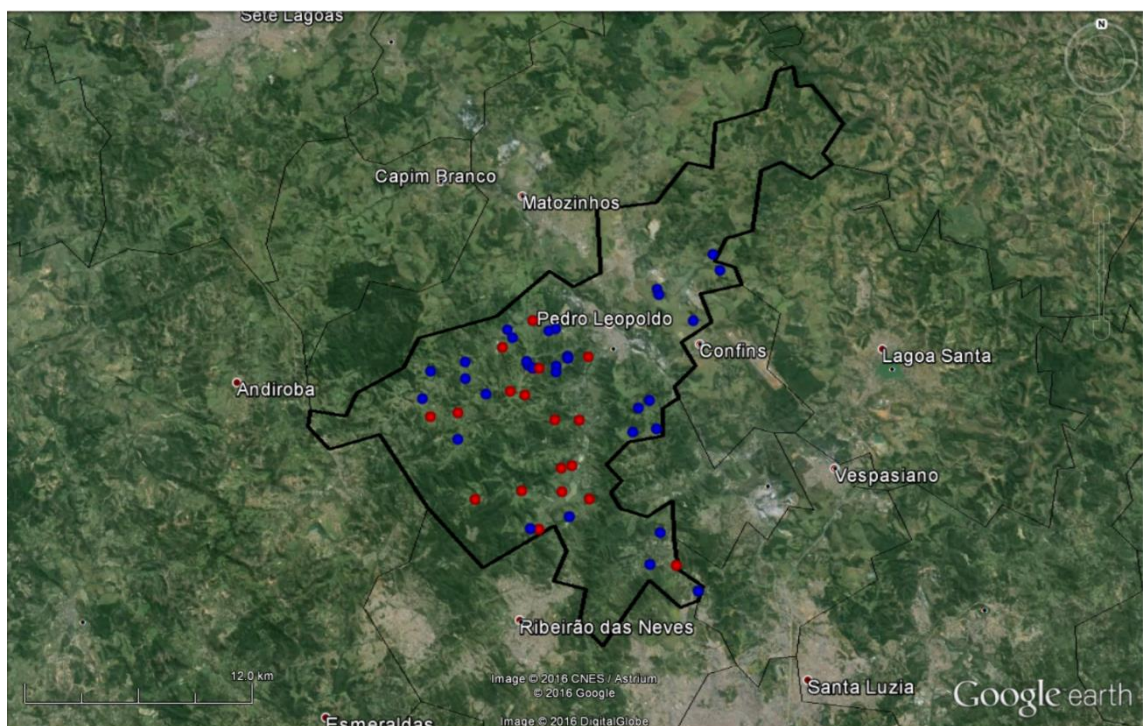


FIGURA 3 - Mapa de dados georreferenciados evidenciando propriedades rurais com bovinos e bubalinos positivos e negativos ao exame coproparasitológico para *Fasciola hepatica*, no município de Pedro Leopoldo, MG.

Legenda: ● Propriedades positivas
● Propriedades negativas

No município de São José da Lapa, foram visitadas 15 propriedades onde foram coletadas 677 amostras de fezes de bovinos e 19 amostras de fezes de bubalinos.

Constatou-se que 35 bovinos e 19 bubalinos estavam infectados, 5,2% e 100% de positividade respectivamente nos animais estudados. A porcentagem de animais positivos nas propriedades variou de 0,0% a 20,0% entre os bovinos e foi de 100% nos bubalinos (TABELA 2).

TABELA 2 - Número total de amostras de fezes coletadas de bovinos e bubalinos nas propriedades visitadas no município de São José da Lapa, MG, número de amostras positivas para ovos de *Fasciola hepatica* e porcentagem de positividade em cada propriedade.

Propriedade	Espécie amostrada	Total de amostras coletadas	Total de amostras positivas	% de animais positivos
1	Bovino	30	3	10,0%
	Bubalino	19	19	100,0%
2	Bovino	64	1	1,6%
3	Bovino	70	5	4,1%
4	Bovino	10	2	20,0%
5	Bovino	57	4	15,8%
6	Bovino	19	3	15,8%
7	Bovino	37	0	0,0%
8	Bovino	20	2	10,0%
9	Bovino	47	0	0,0%
10	Bovino	98	0	0,0%
11	Bovino	67	6	8,9%
12	Bovino	49	2	4,1%
13	Bovino	20	0	0,0%
14	Bovino	39	0	0,0%
15	Bovino	50	0	0,0%

Com base nos dados georreferenciados obtidos com o GPS, foi elaborado um mapa com o objetivo de fornecer uma melhor visualização da distribuição das propriedades pesquisadas no município de São José da Lapa (FIGURAS 4 e 5).

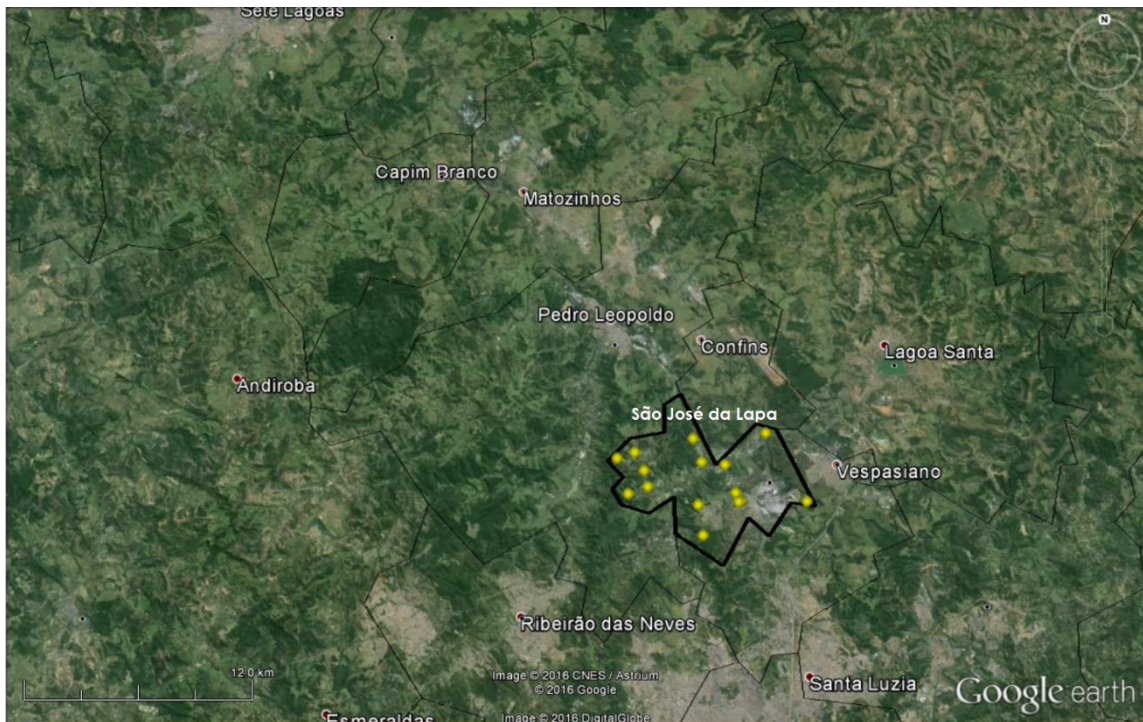


FIGURA 4 - Mapa de dados georreferenciados mostrando a localização das propriedades rurais onde foram realizadas buscas por bovinos e bubalinos naturalmente infectados por *Fasciola hepatica* no município de São José da Lapa, MG.
 Legenda: ● Propriedades rurais visitadas

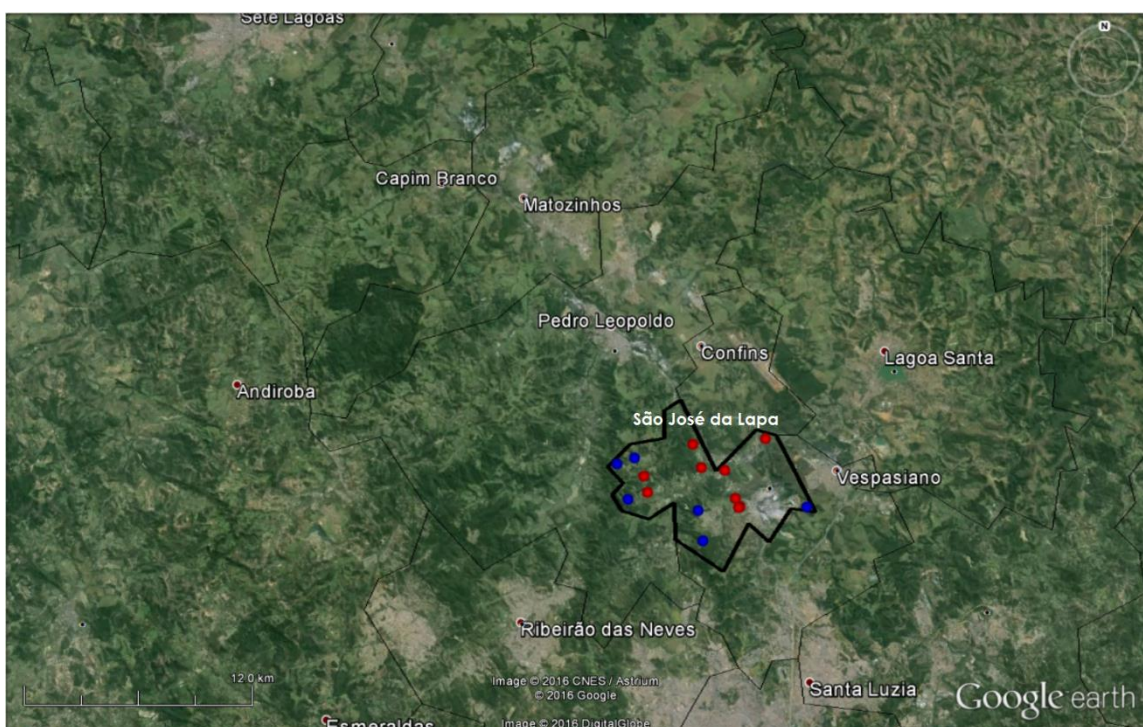


FIGURA 5 - Mapa de dados georreferenciados evidenciando propriedades rurais com bovinos e bubalinos positivos e negativos ao exame coproparasitológico para *Fasciola hepatica*, no município de São José da Lapa, MG.
 Legenda: ● Propriedades positivas
 ● Propriedades negativas

Em relação a ocorrência de animais positivos ao exame para pesquisa de ovos de *F. hepatica*, pode-se constatar que no município de Pedro Leopoldo das 50 propriedades estudadas, 20 apresentaram pelo menos um bovino ou bubalino infectado, representando uma positividade de 40,0%. No município de São José da Lapa, em 15 propriedades, 9 apresentaram pelo menos um bovino ou bubalino infectado, representando uma positividade de 60,0%.

Ao considerar o total de propriedades inseridas em todo o estudo (65), a ocorrência de *F. hepatica* foi de 44,6%. Entretanto não houve diferença significativa da ocorrência entre os dois municípios ($p=0.172$) (GRÁFICO 1).

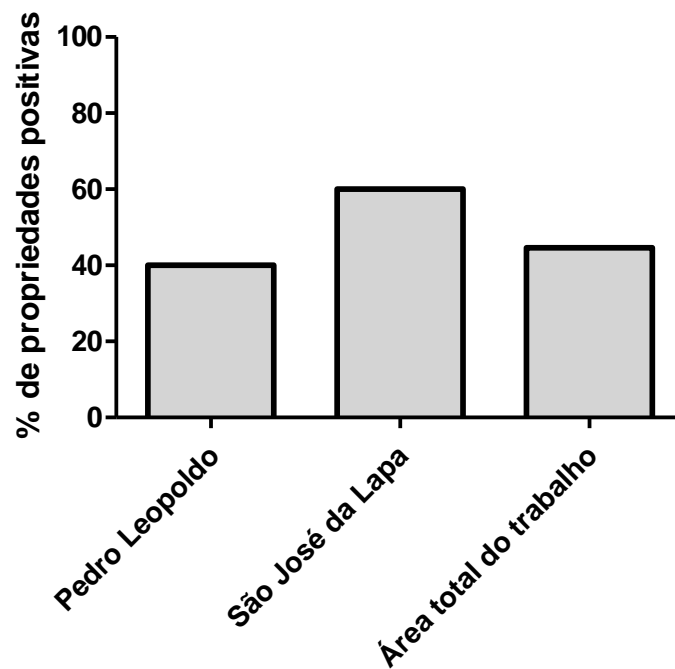


GRÁFICO 1 – Porcentagem de propriedades rurais positivas para *Fasciola hepatica* nos municípios de Pedro Leopoldo (n=50), São José da Lapa (n=15) e a porcentagem total da área estudada (n=65).

3.1.2 Caracterização das propriedades estudadas

Em cada uma das propriedades, foram colhidos dados de identificação e caracterização por meio de questionário (ANEXO 1) direcionado aos proprietários ou responsáveis e por meio de observação direta.

Com base nas respostas obtidas, foi observado que em 43 (66,2%) das 65 propriedades inseridas no estudo, a composição dos rebanhos é formada a partir de animais de origem própria e de animais comprados no município; em 14 (21,5%) são com bovinos de origem própria e adquiridos no município e em municípios próximos e em 8 (12,3%) são somente de animais de origem própria.

Em relação a raça de animais criados, 1 (1,5%) propriedade cria apenas gado Jersey, 3 (4,6%) criam apenas gado Gir e 61 (93,9%) criam gado mestiço.

Sobre o tipo de exploração pecuária praticada, em 48 (73,8%) propriedades o principal tipo é a produção de leite, e em 17 (26,2%) é do tipo mista, voltada para produção de leite e carne.

Em relação ao sistema de produção, 45 (69,2%) produtores optam pelo sistema de pastagem, 20 (30,8%) optam pelo sistema de semi confinamento.

De acordo com a ocorrência de pastagens em áreas alagadas, 57 (87,7%) propriedades não possuem pastagens com áreas alagadas, 6 (9,2%) apresentam pastagens em áreas alagadas com drenagem e 2 (3,1%) apresentam pastagens com áreas alagadas sem drenagem.

Sobre o destino que os produtores dão as fezes, em 34 (52,3%) propriedades, as fezes são utilizadas em esterqueiras, na pastagem e em capineira, em 20 (30,8%) são utilizadas em esterqueiras e na pastagem e em 11 (16,9%) as fezes são utilizadas apenas na pastagem.

Em relação à origem da água oferecida aos animais, em 27 (41,5%) propriedades a água é obtida em poços artesianos, em 21 (32,3%) propriedades os animais bebem em lagoas marginais aos ribeirões ou açudes presentes nas propriedades, em 9 (13,8%) bebem diretamente do Ribeirão do Urubu, em 4 (6,2%) os animais bebem água diretamente do Ribeirão das Neves e também em 4 (6,2%) os animais bebem diretamente do Ribeirão da Mata.

Outro fator importante considerado de risco à dispersão de *F. hepatica* é o compartilhamento do pasto por várias espécies animais. Em 37 (56,9%) propriedades os

bovinos e bubalinos não compartilham o pasto com outras espécies e em 28 (43,1%) existe esse compartilhamento principalmente com equinos.

Constatou-se que 61,5% (40) dos proprietários não tinham conhecimento prévio sobre *F. hepatica*, mediante a apresentação de foto, e 38,5% (25) dizem conhecer o parasito.

Com base nos dados obtidos através de observação direta, as propriedades foram classificadas em relação ao nível de tecnificação. Sendo 2 (3,1%) consideradas de nível alto, 58 (89,2%) de nível médio e 5 (7,7%) de nível baixo.

Ainda com base nos dados obtidos por meio de observação direta, a distância das pastagens (em metros) da fonte natural de água presente nas propriedades foi mensurada. Em 27 (41,5%) propriedades as pastagens ficam a menos de 50 metros da fonte de água, em 12 (18,5%) ficam entre 50 e 150 metros de distância e em 26 (40,0%) não existe uma fonte de água natural ou essa fica a mais de 150 metros de distância das pastagens.

Também foi observado o tipo de relevo das pastagens, sendo divididos em plano, 38 (58,5%) propriedades, e plano/montanhoso, 27 (41,5%) propriedades.

3.1.3 Variáveis relacionadas ao meio ambiente e a infecção por *Fasciola hepatica*

Dentre os fatores que contribuem para a infecção de *F. hepatica* e manutenção do ciclo biológico do parasito no ambiente, pode-se citar alguns fatores relacionados às características ambientais nas propriedades, como clima, topografia, presença de fonte natural de água, presença de hospedeiros vertebrados e invertebrados susceptíveis a infecção.

No presente trabalho, a associação entre as variáveis ambientais e a infecção por *F. hepatica*, quando avaliadas separadamente, mostrou que apenas a topografia do terreno (plano ou montanhoso) não se associou significativamente a infecção pela *F. hepatica* nas propriedades estudadas (TABELA 3).

As demais variáveis tiveram associação positiva, ou seja, nas propriedades que possuem área de pasto alagadas, onde a origem da água oferecida aos animais é proveniente de ribeirões, lagoas ou açudes, onde essa fonte de água fica a menos de 50 metros das pastagens e onde há a presença de moluscos *Lymnaea*, a infecção pelo parasito foi maior quando comparada àquelas propriedades que não apresentam essas características.

TABELA 3 - Infecção por *Fasciola hepatica* nos animais das propriedades rurais dos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, MG, segundo variáveis relacionadas à fatores ambientais observados

Variáveis	Número de propriedades	Infecção		Valor p
		Sim n (%)	Não n (%)	
Áreas de pastagem				0.001
Área não alagada	57	21 (36,8%)	36 (63,2%)	
Área alagada	6	8 (100,0%)	0 (0%)	
Distância das pastagens até a fonte de água natural presente				0.000
< 50 metros	27	23 (85,2%)	4 (14,8%)	
> 50 metros	38	6 (15,8%)	32 (84,2%)	
Topografia				0.123
Relevo plano	38	20 (52,6%)	18 (47,4%)	
Relevo plano / montanhoso	27	9 (33,3%)	18 (66,7%)	
Presença de <i>Lymnaea</i> spp.				0.000
Sim	32	28 (87,5%)	4 (12,5%)	
Não	33	1 (3%)	32 (97%)	
Origem da água oferecida aos animais				0.000
Ribeirão, lagoa ou açude	38	28 (73,7%)	10 (26,3%)	
Poço artesiano	27	1 (3,7%)	26 (96,3%)	

3.1.4 Variáveis relacionadas ao manejo do rebanho e a infecção por *Fasciola hepatica*

A ocorrência e prevalência da *F. hepatica* também está diretamente associada à fatores antrópicos, relacionados com tipo de manejo dos rebanhos, compartilhamento do pasto com outras espécies animais, comercialização de animais contaminados para áreas livres de infecção, destino que é dado às fezes dos animais infectados e a falta de conhecimento sobre o parasito por parte dos produtores.

Em nosso trabalho, a associação entre as variáveis relacionadas ao manejo do rebanho e a infecção por *F. hepatica*, mostrou que apenas o destino que é dado as fezes dos animais e o conhecimento dos produtores sobre o parasito associou-se significativamente a infecção pelo parasito nas propriedades estudadas (TABELA 4).

TABELA 4 - Infecção por *Fasciola hepatica* no animais das propriedades rurais dos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, MG, segundo variáveis relacionadas ao manejo dos rebanhos.

Variáveis	Número de animais	Infecção		Valor p
		Sim n (%)	Não n (%)	
Origem dos animais				0.739
Origem na propriedade	8	4 (50%)	4 (50%)	
Origem na propriedade e compra no município	43	20 (46,5%)	23 (53,5%)	
Origem na propriedade, município e outros municípios	14	5 (35,7%)	9 (64,3%)	
Tipo de exploração				0.316
Leite	50	24 (48%)	26 (52%)	
Misto	15	5 (33,3%)	10 (66,7%)	
Sistema de produção				0.238
Pastagem	42	21 (50%)	21 (50%)	
Pastagem e confinamento	23	15 (65,2%)	8 (34,8%)	
Destino das fezes				0.000
Pastagem	11	11 (100%)	0 (0%)	
Esterqueira e pastagem	20	7 (35%)	13 (65%)	
Esterqueira, capineira e pastagem	34	11 (32,4%)	23 (67,6%)	
Compartilhamento do pasto com outras espécies				0.206
Sim	28	15 (53,6%)	13 (46,4%)	
Não	37	14 (37,8%)	23 (62,2%)	
Conhecimento sobre <i>Fasciola hepatica</i>				0.000
Sim	25	22 (88%)	3 (12%)	
Não	40	7 (17,5%)	33 (82,5%)	
Nível de tecnificação do sistema de produção				0.967
Alto	2	1 (50%)	1 (50%)	
Médio	58	26 (44,8%)	32 (55,2%)	
Baixo	5	2 (40%)	3 (60%)	

3.1.5 Análise dos fatores associados à infecção por *Fasciola hepatica*

3.1.5.1 Análise uni variada

Em relação às variáveis relacionadas ao meio ambiente, os dados mostraram que as propriedades onde a distância das pastagens até a fonte de água natural presente era menor que 50 metros apresentaram maiores taxas de infecção pelo parasito (85,2%) quando comparado àquelas com distância superior a 50 metros e esta diferença foi estatisticamente significativa (OR 30.667; p=0.000). Outro fator que contribuiu para o aumento da infecção por *F. hepatica* foi a presença de *Lymnaea* spp.. Nas propriedades onde foram identificados esses moluscos foi observada uma maior taxa de infecção (87,5%) (OR 224.000; p = 0.000).

Além desses fatores, a origem da água oferecida aos animais, também apresentou uma associação significativa com a infecção pela *F. hepatica* nas propriedades, ou seja, aqueles animais que utilizam água potencialmente não segura para beber tais como: ribeirão, lagoa ou açude apresentaram uma maior taxa de infecção comparada aqueles que utilizam o poço artesiano com fonte de água (73,7%) (OR 72.800; p=0.000) (TABELA 5). Não foi observado associação significativa entre a topografia das pastagens e a infecção pela *F. hepática*.

TABELA 5 - Odds Ratio (OR) e valor de p dos fatores ambientais em relação à infecção pela *Fasciola hepatica* nos animais das propriedades rurais dos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, Minas Gérias.

Variáveis	Infecção n (%)		OR	Valor p
	Positivo	Negativo		
Distância das pastagens até a fonte de água natural presente			30.667	0.000
< 50 metros	23 (85,2%)	4 (14,8%)		
> 50 metros	6 (15,8%)	32 (84,2%)		
Topografia das pastagens			2.222	0.126
Relevo plano	20 (52,6%)	18 (47,4%)		
Relevo plano / montanhoso	9 (33,3%)	18 (66,7%)		
Presença de <i>Lymnaea</i> spp.			224.000	0.000
Sim	28 (87,5%)	4 (12,5%)		
Não	1 (3%)	32 (97%)		
Origem da água			72.800	0.000
Ribeirão, lagoa ou açude	28 (73,7%)	10 (26,3%)		
Poço artesiano	1 (3,7%)	26 (96,3%)		

Em relação às variáveis relacionadas com o manejo do rebanho, foi observado que apenas a variável “Conhecimento sobre *F. hepatica*” associou-se à infecção ao parasito (OR 34.571; p=0.000).

Ao analisarmos a origem dos animais do rebanho, tipo de exploração pecuária, sistema de produção da propriedade, o compartilhamento da pastagem com outras espécies animais e o nível de tecnificação da produção, não foram observadas associações significativas dessas variáveis na infecção pela *F. hepatica* (TABELA 6).

TABELA 6 - Odds Ratio (OR) e valor de p das características de manejo do rebanho em relação à infecção pela *Fasciola hepatica* nos animais das propriedades rurais dos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, Minas Gérias.

Variáveis	Infecção n (%)		OR	Valor p
	Sim n (%)	Não n (%)		
Origem dos animais			1.800	0.741
Origem na propriedade	4 (50%)	4 (50%)		
Origem na propriedade e compra no município	20 (46,5%)	23 (53,5%)		
Origem na propriedade, município e outros municípios	5 (35,7%)	9 (64,3%)		
Tipo de exploração			0.542	0.320
Leite	24 (48%)	26 (52%)		
Misto	5 (33,3%)	10 (66,7%)		
Sistema de produção			0.533	0.241
Pastagem	21 (50%)	21 (50%)		
Pastagem e confinamento	15 (65,2%)	8 (34,8%)		
Compartilhamento de pastagem com outras espécies			1.896	0.208
Sim	15 (53,6%)	13 (46,4%)		
Não	14 (37,8%)	23 (62,2%)		
Conhecimento sobre <i>Fasciola hepatica</i>			34.571	0.000
Sim	22 (88%)	3 (12%)		
Não	7 (17,5%)	33 (82,5%)		
Nível de tecnificação do sistema de produção			1.500	0.967
Alto	1 (50%)	1 (50%)		
Médio	26 (44,8%)	32 (55,2%)		
Baixo	2 (40%)	3 (60%)		

3.1.5.2 Análise multivariada

Com o objetivo de determinar o efeito independente da associação entre as covariáveis que apresentaram um nível de significância de $p < 0,20$ e a infecção pela *F. hepatica* nas propriedades rurais nos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, foi realizada uma análise multivariada.

No modelo final de regressão logística binária para infecção pela *F. hepatica*, foram incluídas as variáveis: distância da fonte de água natural até as pastagens, topografia do terreno, presença do molusco, origem da água oferecida aos animais, sistema de produção, compartilhamento do pasto e conhecimento sobre o parasito.

Após o ajuste do modelo de regressão foi observado que as variáveis “distância da água” e “origem da água” associou-se com a infecção pela *F. hepatica*. Propriedades onde a origem da água oferecida aos animais era de ribeirões, lagoas ou açude e que tinham suas pastagens a menos de 50 metros de distância da água apresentaram uma maior chance de adquirir a infecção pela *F. hepática* (OR 21,6; OR 6,9), respectivamente. Já aquelas propriedades onde a água oferecida era de poço artesiano e suas pastagens ficavam a mais de 50 metros de distância da água apresentaram uma menor chance de adquirir a doença (TABELA 7).

TABELA 7 - Modelo final de regressão logística das variáveis independentes pesquisadas em relação à infecção por *Fasciola hepatica* nos animais das propriedades rurais nos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, MG.

Variáveis	OR	IC (95%)	Valor de p
Distância da água			
< 50 metros	6.900	(1,404-33,919)	0,017
> 50 metros	1,00		
Origem da água			
Ribeirão, lagoa ou açude	21.667	(2,122-221,203)	0,009
Poço artesiano	1,00		

Nota: $R^2 = 0,484$; Teste Hosmer and Lemeshow: $p = 1,00$

3.2 Viabilidade dos ovos e miracídios obtidos

Os ovos recuperados das fezes de todos os bovinos e bubalinos naturalmente infectados foram incubados, e após o período de incubação (8 - 14 dias) foram observados miracídios formados no interior dos ovos (FIGURA 6).

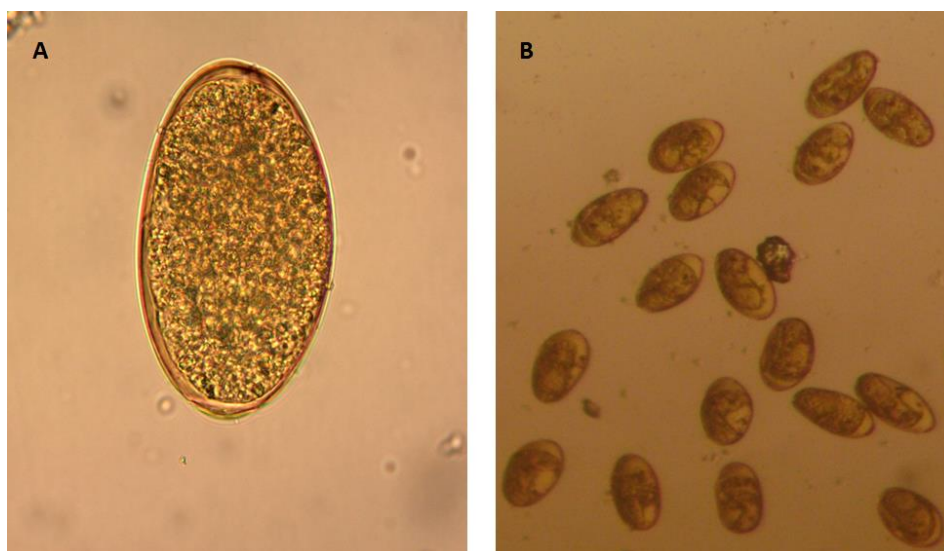


FIGURA 6 - A) Ovo de *Fasciola hepatica* recuperado das fezes de bovinos e bubalinos naturalmente infectado (100X). B) Ovo de *F. hepatica* após incubação, com miracídios em seu interior (10X).

Em relação à viabilidade dos miracídios, no 50º dia pós infecção, os moluscos foram transferidos individualmente para placas de petri e deixados sob foco de luz por 5 horas por dia para estimular a eliminação de cercárias. Aos 57º dpi foi observada a primeira eliminação espontânea de cercárias. Essas se encistaram no filme plástico do fundo e paredes das placas onde os caramujos se encontravam, nas folhas de alface oferecidas como alimento e nas conchas dos próprios moluscos (FIGURAS 7 a 9).



FIGURA 7 - Cercárias de *Fasciola hepatica* que emergiram de *Lymnaea columella* infectada com dois miracídios (40X).

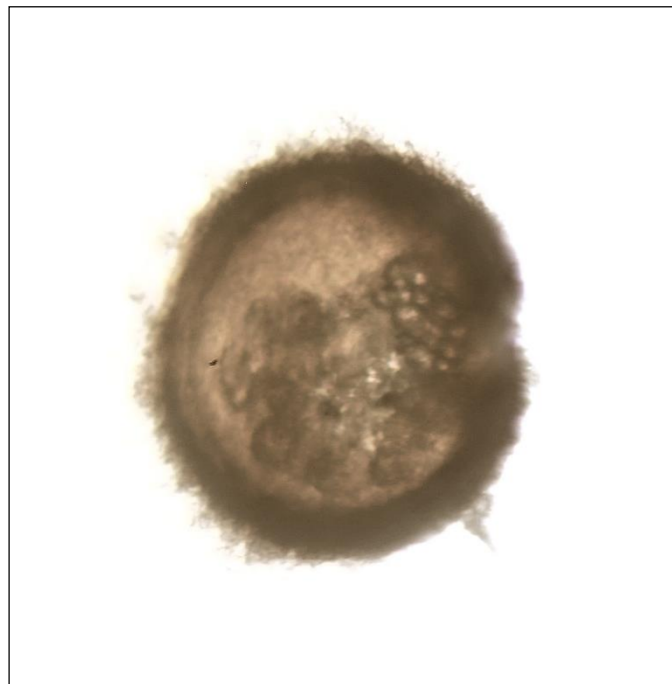


FIGURA 8 - Metacercária de *Fasciola hepatica* obtida de *Lymnaea columella* infectada com dois miracídios (100X).

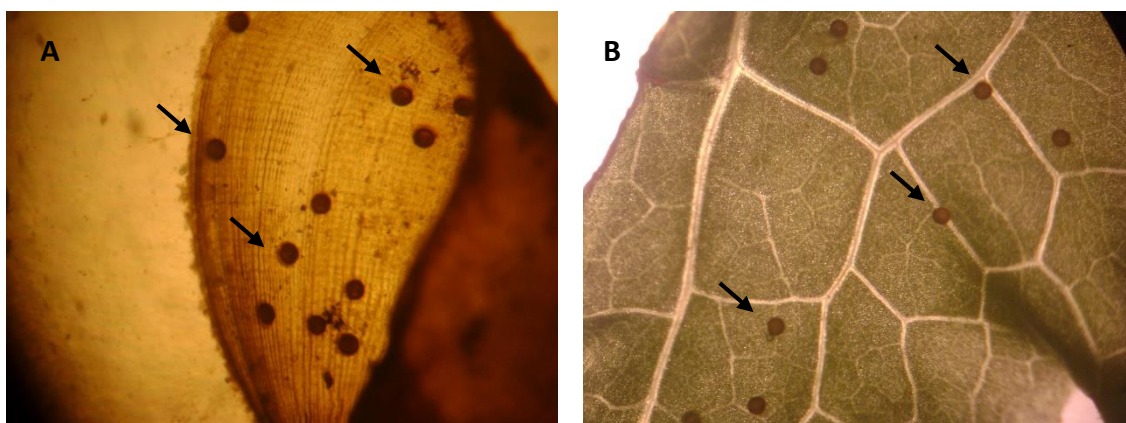


FIGURA 9 - A) Metacercárias de *Fasciola hepatica* encistadas na concha de *Lymnaea columella* (20X). B) Metacercárias de *F. hepatica* encistadas em folha de alface (10X).

3.3 Coleta de *Lymnaea* spp. e taxa de infecção natural por *Fasciola hepatica*

Nas 65 propriedades rurais pertencentes aos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa foram realizadas as buscas por moluscos *Lymnaea*. Em 32 (49,2%) propriedades foram observados moluscos, sendo que em 2, estes estavam presentes nos bebedouros dos animais, em 14 nas margens de lagoas ou açudes dentro das propriedades e em 16 nas margens dos Ribeiros da Mata, das Neves, Carrancas ou do Urubu. Foram coletados um total de 778 exemplares conforme descrito na TABELA 8.

TABELA 8 - Total de exemplares de *Lymnaea* spp. coletados nas propriedades rurais estudadas nos municípios de Pedro Leopoldo (PL) e São José da Lapa (SJL), MG e local onde os moluscos foram encontrados.

Propriedade	Município	Total de moluscos coletados	Local de coleta
1	PL	17	Lagoa marginal ao Ribeirão da Mata
2	PL	192	Bebedouro dos animais
3	PL	30	Ribeirão das Neves
4	PL	14	Ribeirão das Neves
5	PL	27	Ribeirão das Neves
6	PL	0	-
7	PL	29	Lagoa marginal ao Ribeirão das Neves
8	PL	26	Lagoa marginal ao Ribeirão das Neves
9	PL	0	-
10	PL	0	-
11	PL	0	-
12	PL	0	-
13	PL	0	-
14	PL	28	Lagoa marginal ao Ribeirão das Neves
15	PL	32	Ribeirão da Mata
16	PL	25	Ribeirão da Mata
17	PL	21	Ribeirão do Urubu
18	PL	0	-
19	PL	8	Ribeirão do Urubu
20	PL	19	Ribeirão do Urubu
21	PL	0	-
22	PL	7	Ribeirão do Urubu
23	PL	11	Ribeirão do Urubu
24	PL	6	Ribeirão do Urubu
25	PL	12	Ribeirão do Urubu
26	PL	5	Ribeirão do Urubu
27	PL	6	Ribeirão do Urubu
28	PL	0	-
29	PL	0	-
30	PL	0	-
31	PL	0	-
32	PL	0	-
33	PL	0	-
34	PL	0	-
35	PL	0	-
36	PL	26	Bebedouro dos animais
37	PL	27	Lagoa marginal ao Ribeirão da Mata

38	PL	48	Lagoa marginal ao Ribeirão da Mata
39	PL	33	Lagoa marginal ao Ribeirão da Mata
40	PL	0	-
41	PL	0	-
42	PL	0	-
43	PL	0	-
44	PL	0	
45	PL	0	-
46	PL	0	-
47	PL	0	-
48	PL	0	-
49	PL	0	-
50	PL	0	-
51	SJL	6	Lagoa marginal ao Ribeirão Carrancas
52	SJL	23	Lagoa marginal ao Ribeirão da Mata
53	SJL	24	Lagoa marginal ao Ribeirão Carrancas
54	SJL	12	Lagoa marginal ao Ribeirão Carrancas
55	SJL	16	Ribeirão da Mata
56	SJL	7	Ribeirão da Mata
57	SJL	0	-
58	SJL	18	Açude
59	SJL	0	-
60	SJL	0	-
61	SJL	9	Açude
62	SJL	14	Açude
63	SJL	0	-
64	SJL	0	-
65	SJL	0	-

Os exemplares enviados ao Laboratório de Helminologia e Malacologia Médica, Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte – MG para identificação da espécie, foram identificados como *Lymnaea columella* (ANEXO 2).

Após a análise parasitológica dos moluscos (n=669), para verificar a taxa de infecção natural por *F. hepatica*, em apenas dois moluscos (0,3%) foram observadas formas imaturas do parasito (rédias). As formas larvais encontradas foram identificadas baseado em sua morfologia, de acordo com Andrews (1999) (FIGURA 10).



FIGURA 10 - Rédia de *Fasciola hepatica* recuperada do *Lymnaea columella* naturalmente infectado (100X).

4. Discussão

No presente trabalho, realizado com rebanhos bovinos e bubalinos provenientes de 65 propriedades rurais, nos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, MG, observou-se uma prevalência de 44,6% de positividade nessas propriedades e a taxa de positividade entre os bovinos variou de 0 a 54,9% e entre os bubalinos de 3,4 a 100,0%.

No município de Pedro Leopoldo, das 2.689 amostras analisadas de bovinos e das 55 de bubalinos, 83 (3,1%) e 2 (3,6%) foram positivas para ovos do parasito, respectivamente. No município de São José da Lapa, das 677 amostras de bovinos e 19 de bubalinos, 35 (5,2%) e 19 (100%) foram positivas, respectivamente.

Ainda são poucos os estudos realizados no Brasil voltados para a epidemiologia, dispersão e prevalência da *F. hepatica* em seus hospedeiros invertebrados e vertebrados. Embora seja conhecido que o parasito está em expansão no território brasileiro, a grande parte dos trabalhos realizados são principalmente nos estados das regiões Sul (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná) e Sudeste (São Paulo e Espírito Santo) do país, considerados enzoóticos.

Também são escassos são os trabalhos realizados para diagnosticar e estimar a prevalência de *F. hepatica* em rebanhos, por métodos coprológicos, sendo mais comum a realização de trabalhos com base nos dados provenientes de abatedouros e de serviços de inspeção.

Os inquéritos coprológicos, quando voltados para rebanhos criados para a produção de leite, são de grande importância, pois proporcionam a real estimativa da prevalência do parasito em animais que podem permanecer infectados por anos, uma vez que não são criados para uma produção rápida, como os animais para corte e abate, permanecendo como fonte de contaminação constante para o ambiente e outros animais por longos períodos.

O diagnóstico laboratorial baseado na observação dos ovos do parasito nas fezes dos animais é essencial para o registro da infecção e conseqüentemente contribui para um controle adequado visando melhorar a produção animal (Lima et al., 2009).

Em geral, os dados observados na literatura, diferentemente do observado nesse trabalho, demonstram maiores taxas de prevalência entre os animais e maior número de propriedades com a presença do parasito tanto no estado de Minas Gerais (Faria et al., 2005; Lima et al., 2009) quanto em outros estados das regiões sudeste (Gomes et al., 2002; Carneiro et al., 2010; Alves et al., 2011).

As elevadas taxas de infecção observadas por esses autores podem estar associadas ao fato dos trabalhos terem sido realizados em regiões já conhecidas e consideradas como enzoóticas para o parasito.

Apesar de Minas Gerais apresentar baixas taxas da infecção em seus rebanhos, municípios, como Pedro Leopoldo e São José da Lapa, incluídos nesse levantamento, apresentam características ambientais, climáticas e hidrográficas propícias à manutenção e ocorrência do ciclo de *F. hepatica*. Fatores antrópicos relacionados ao comércio indiscriminado de sem um adequado controle sanitário e o tipo de manejo do rebanho, também são características associadas a epidemiologia da fasciolose, e são observadas na região estudada.

Fato, que segundo diversos autores, facilita a dispersão do parasito no estado, podendo vir a se tornar uma região enzoótica dessa parasitose (Gomes et al., 2002; Faria et al., 2005; Lima et al., 2009; Bellato et al., 2009; Carneiro et al., 2010; Alves et al., 2011; Dracz & Lima, 2014).

Após a primeira análise das variáveis relacionadas ao ambiente e ao manejo do rebanho, para verificar as possíveis relações entre essas variáveis e a presença da infecção, foi constatado que nas propriedades que possuem área de pasto alagadas, onde a origem da água oferecida aos animais é proveniente de ribeirões, lagoas ou açudes, e a fonte de água fica a menos de 50 metros das pastagens e há a presença de *Lymnaea*, a infecção foi maior quando comparada àquelas propriedades que não apresentam essas características. E para a nossa área de estudo, a variável relacionada a topografia do terreno não apresentou associação com a ocorrência de infecção.

A associação dessas características com a ocorrência da fasciolose corroboram com a observação realizada por outros autores também na região sudeste do país (Gomes et al., 2002; Faria et al., 2005; Lima et al., 2009; Alves et al., 2011).

Após a segunda análise, para analisar a força de associação dessas variáveis com a presença da infecção, foi constatado que em relação as variáveis relacionadas ao meio ambiente, as propriedades onde a distância das pastagens até a fonte de água natural era menor que 50 metros, onde foi constatada a presença de *Lymnaea* e onde a origem da água oferecida aos animais era de ribeirões, lagoas ou açudes, apresentaram maiores taxas de infecção (85,2%, 87,5%, e 73,7%, respectivamente).

Em relação as variáveis relacionadas ao manejo, apenas as propriedades em que os produtores diziam ter conhecimento pelo parasito, houve maiores taxas de infecção (88%), fato que não corrobora com os dados de Faria et al. (2005 e Lima et al. (2009).

Também é interessante ressaltar que apesar de não ter sido possível estabelecer uma força de associação entre as variáveis que diziam respeito às áreas de pastagem e o destino final dados as fezes, é sabido que a presença de áreas alagadas e de ovos nas pastagens são considerados fatores biológicos importantes e de risco para a disseminação da fasciolose, pois promovem um ambiente favorável ao desenvolvimento do molusco e da manutenção do ciclo do parasito (Alves et al., 2011; Carneiro et al., 2013).

Dentro desse contexto, quando as variáveis relacionadas ao meio ambiente e ao manejo do rebanho foram avaliadas em conjunto no modelo multivariado, apenas a distância da água e a origem da mesma apresentaram associação entre si e a ocorrência da infecção em nossa região de estudo. Ou seja, não apenas a presença de uma fonte de água próximo as pastagens é considerado um fator associado a ocorrência da infecção, mas também que essa fonte de água seja de origem em ribeirões, lagoas ou açudes.

Pesquisas visando estabelecer a associação de fatores e características já descritas na região sudeste como importantes para a fasciolose, foram realizados, principalmente no estado do Espírito Santo (Alves et al., 2011; Carneiro et al., 2013; Martins et al., 2014).

Tanto quanto, ou ainda mais escassos, são os trabalhos realizados voltados para a prevalência de *F. hepatica* em seus hospedeiros intermediários, moluscos limneídeos nessa região.

Estes moluscos apresentam grande capacidade de colonizar novos habitats quando introduzidas naturalmente ou artificialmente no ambiente, e a presença do hospedeiro intermediário em propriedades rurais onde ocorre a criação de bovinos, bubalinos e outras espécies de vertebrados susceptíveis à infecção por *F. hepatica*, é um fator indispensável para o estabelecimento e manutenção do ciclo biológico do parasito (Medeiros et al., 2014). Além de fazer com que seu controle se torne grandemente dificultado, já que dentre as medidas preconizadas, inclui-se o controle dos moluscos (Araújo et al., 1995).

Em nosso trabalho, foi observado que dentre as 65 propriedades estudadas, em 32 (49,2%), havia a presença de moluscos *Lymnaea columella*.

Dos 669 moluscos que foram coletados e dissecados para a procura de estágios larvais de *F. hepatica*, em apenas 2 (0,3%), foram observadas rédias e cercárias. Esse dado ressalta que a prevalência de hospedeiros intermediários naturalmente infectados é muito baixa na região estudada, o que corrobora com os achados de outros autores, mesmo que realizados em outras regiões e estados da região sul e sudeste (Ueta, 1980b; Silva et al., 1995; Coelho & Lima, 2003; Lima et al., 2009; Martins et al., 2014).

Deve-se ressaltar, que mesmo com a pequena porcentagem de moluscos encontrados naturalmente infectados, tanto nesse trabalho quanto em outros descritos na literatura, muitos autores descrevem que a presença do molusco associada a uma grande bacia hidrográfica na região de estudo, é um importante fator na dispersão do parasito para outras regiões e subsequentemente, no aumento do número de vertebrados infectados (Lima et al., 2009; Alves et al., 2011; Carneiro et al., 2013).

Fato que pode ser observado nos dois municípios estudados. A principal fonte de água em grande parte das propriedades é proveniente da mesma bacia hidrográfica, a bacia do Rio das Velhas, e de seus afluentes, principalmente os Ribeirões da Mata e das Neves. Grande parte das propriedades positivas para a infecção por *F. hepatica* estão localizadas próximas a esses ribeirões, que atravessam para outros municípios e podem servir como fonte de disseminação para outras localidades.

Além de se estudar a taxa de infecção natural dos hospedeiros invertebrados *in loco*, o estudo da biologia e da susceptibilidade das espécies de limneídeos ao parasito também é importante para melhor entendimento da epidemiologia da fasciolose.

Apesar da pequena taxa de infecção natural observada nos moluscos provenientes de Pedro Leopoldo e de São José da Lapa, a susceptibilidades desses foi testada em laboratório, pela infecção de miracídios provenientes de ovos recuperados de bovinos e bubalinos também desses municípios. Foi observado que os miracídios eclodiram dos ovos entre 12 e 14 dias de incubação, e que após a infecção dos moluscos, cercárias foram eliminadas espontaneamente aos 57º dias. Esses dados corroboram com outros autores que também avaliaram a participação e potencial de *L. columella* como hospedeiro intermediário no ciclo da *F. hepatica*, a partir de infecções experimentais (Ueta, 1980a; Dacal et al., 1988; Mendes, 2006; Coelho et al., 2008; Coelho et al., 2009).

Dessa forma, ressalta-se que a presença de *F. hepatica*, em regiões onde a pecuária constitui uma das principais atividades econômicas, deve merecer atenção especial, levando se em conta as perdas que sofrem os animais e os produtores. E o estudo dos fatores ambientais e antrópicos relacionados à ocorrência e prevalência do parasito na região, bem como o estudo dos hospedeiros intermediários infectados, são de grande importância para se conhecer a distribuição do parasito e estabelecer medidas de controle e de profilaxia.

5. Referências bibliográficas

ALVES D. P.; CARNEIRO M. B.; MARTINS I. V. F.; BERNARDO C. C.; DONATELE D.M.; PEREIRA JÚNIOR O. S.; ALMEIDA B. R.; AVELAR B. R.; LEÃO A. G. C.; ALVES, D. P. Distribution and factors associated with *Fasciola hepatica* infection in cattle in the south of Espírito Santo State, Brazil. J. Ven. An. And Tox. Trop. Dis., 17: 271-276, 2011.

ARAÚJO J. L. B.; LINHARES G. F. C.; PAÇO J. M. Ocorrência de *Lymnaea columella* (say, 1817) (mollusca, pulmonata, lymnaeidae), no estado de Goiás. Considerações sobre os parasitos por ela transmitidos. Rev. Pat. Trop., 24(2): 291-300, 1995.

BELLATO V.; SOUZA A. P.; SARTOR A. A.; VEIGA L. P. H. N.; CENTENARO F. *Fasciola hepatica* occurrence in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) and bovines (*Bos taurus*) in Timbó, SC, Brazil. Ver. Ciênc. Agrovet., 8(1): 66-70, 2009.

BENNEMA S. C.; SCHOLTE R. G. C.; MOLENTO M. B.; MEDEIROS C.; CARVALHO O. S. *Fasciola hepatica* in bovines in Brazil: data availability and spatial distribution. Med. Trop. São Paulo, 56(1): 35-41, 2014.

CARNEIRO M. B.; BERNARDO C. C.; JUNIOR A. C.; ALVES D. P.; JUNIOR O. S. P. MARTINS I. V. F. *Fasciola hepatica* in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in the southern Espírito Santo. Rev. Bras. Med. Vet., 32(2): 89-91, 2010.

CARNEIRO M. B.; ALVES D. P.; DONATELE D. N.; PEREIRA JUNIOR O. S.; MARTINS I. V. *Fasciola hepatica* in sheep, goats and buffaloes in southern municipalities of Espírito Santo state. Arq. Inst. Biol., 80(4): 442-446, 2013.

COELHO L. H. L. & LIMA W. S. Population dynamics of *Lymnaea columella* and its natural infection by *Fasciola hepatica* in the State of Minas Gerais, Brazil, J. Helminthol., 77(1): 7-10, 2003.

COELHO L. H.; GUIMARÃES M. P.; LIMA W. S. Influence of shell size of *Lymnaea columella* on infectivity and development of *Fasciola hepatica*. J. Helminthol., 82(1): 77-80, 2008.

COELHO, L. H. L.; LIMA, W. S.; GUIMARAES, M. P. Sympatric and allopatric combinations of *Lymnaea columella* and *Fasciola hepatica* from southern and south-eastern Brazil. J. Helminthol., 83(03): 285-288, 2009.

DACAL A. R. M.; COSTA H. M. A.; LEITE A. C. R. Susceptibilidade de *Lymnaea* (*Pseudosuccinea*) *columella* (Say, 1817) exposta à infecção por miracídeos de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo, 30(5): 361-369, 1988.

DRACZ R. M.; LIMA W. S. Autochthonous infection of buffaloes and cattle by *Fasciola hepatica* in Minas Gerais, Brazil. Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal, 23(3): 413-416, 2014.

FARIA R. N.; CURY M. C.; LIMA W. S. Prevalence and dynamics of natural infection with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) in brazilian cattles. Revue Méd. Vét., 156: 85-86, 2005.

GIRÃO, E. S.; UENO, H. Técnica de 4 tamises para o diagnóstico coprológico quantitativo da fasciolose dos ruminantes. Pesquisa Agropecuária Brasileira., Brasília, v. 20, n. 14, p. 905-912, agosto, 1985.

GOMES F. F.; SANTOS J. A.; OLIVEIRA F. C. R.; LOPES C.W.G. Estabelecimento de foco de fasciolose hepática em propriedade do município de Campos Dos Goytacazes no Estado Do Rio De Janeiro, Brasil. Rev. Bras. Parasitol. Vet., 11(2): 53-56, 2002.

LIMA W. S.; BARÇANTE J. M. P.; BARÇANTE T.A.; GUIMARÃES M. P.; SOARES L. R. M. Occurrence of *Fasciola hepatica* (LINNAEUS, 1758) infection in Brazilian cattle in the State of Minas Gerais. Rev. Bras. Parasitol. Vet., 18: 1-10, 2009.

MARTINS I. V. F.; AVELAR B. R.; PEREIRA M. J. S.; FONSECA A. H. Application of a geographical information system approach for risk analysis of fascioliasis in southern Espírito Santo state, Brazil. *Geospatial Health.*, 6(3): S87-S93, 2012.

MARTINS I. V. F.; AVELAR B. R.; BERNARDO C. C.; LEÃO A. C.; PEREIRA M. J. S. Distribution of bovine fasciolosis and associated factors in south Espírito Santo, Brazil: an update. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, Jaboticabal, 23(1): 23-29, Jan-Mar 2014.

MEDEIROS C.; SCHOLTEC R. G. C.; D'AVILA S.; CALDEIRA R. L.; CARVALHO O. S. Spatial distribution of lymnaeidae (mollusca, basommatophora), intermediate host of *Fasciola hepatica* linnaeus, 1758 (trematoda, digenea) in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 56(3): 235-252, 2014.

MENDES E. A. Comportamento e desenvolvimento de *Fasciola hepatica* (1758) de bovinos naturalmente infectados em sagüi (*Callithrix penicillata*) e gerbil (*Meriones unguiculatus*). Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 134p, 2006.

OLIVEIRA E. L. Prevalência e fatores associados à distribuição da *Fasciola hepatica*, Linnaeus, 1758 em bovinos dos Municípios de Careaçú e Itajubá, Região da Bacia do Rio Sapucaí-Minas Gerais. 2008.100f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 100p, 2008.

OLIVEIRA S. M.; FUJII T. U.; SPÓSITO FILHA E.; MARTINS A. M. C. R. P. F. Ocorrência de *Lymnaea columella* say, 1817 infectada naturalmente por *Fasciola hepatica* (linnaeus, 1758), no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, 69(1): 29-37, 2002.

SILVA R. E.; LIMA W. S.; CALDAS W. S.; CURY M. C.; MALACCO A. F. Primeiro encontro de *Lymnaea columella* (Say, 1817) naturalmente infectada por estádios intermediários de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) na cidade de Itajubá, MG. In XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia, Goiás, p. 205, 1995.

UETA M. T. Infecção experimental de *Lymnaea columella* por *Fasciola hepatica*. Rev. Saúde Públ., de São Paulo, 11(1): 43-57, 1980a.

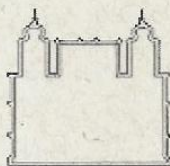
UETA M. T. Ocorrência de infecção natural de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 em *Lymnaea columella* Say, 1817 no Vale do Paraíba, SP, Brasil. Rev. Saúde Públ., de São Paulo, 14: 230-233, 1980b.

6. Anexos

ANEXO 1 – Questionário aplicado aos proprietários ou responsáveis pelas propriedades rurais visitadas no município de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, Minas Gerais, durante levantamento epidemiológico em bovinos e bubalinos

Questionário para o produtor/responsável			
Identificação			
Propriedade:			
Proprietário / Responsável:			
Localidade / Bairro:			
Categoria animal amostrada:			
Raça:			
Número de amostras coletadas:			
Ponto GPS:			
Data:			
Entrevista objetiva			
Qual a origem dos animais do rebanho:	<input type="checkbox"/> Origem na propriedade	<input type="checkbox"/> Compra no município	<input type="checkbox"/> Compra em outros municípios
Qual o tipo de exploração pecuária:	<input type="checkbox"/> Leite	<input type="checkbox"/> Misto	
Qual o tipo de sistema de produção:	<input type="checkbox"/> Pastagem	<input type="checkbox"/> Confinamento e Pastagem	<input type="checkbox"/> Confinamento
Onde se encontram as áreas de pastagem:	<input type="checkbox"/> Áreas não alagadas	<input type="checkbox"/> Áreas alagadas com drenagem	<input type="checkbox"/> Áreas alagadas sem drenagem
Destino final das fezes do curral de manejo:	<input type="checkbox"/> Esterqueira	<input type="checkbox"/> Capineira	<input type="checkbox"/> Pastagem
Qual a origem da água oferecida aos animais:	<input type="checkbox"/> Ribeirão / Lagoa / Açude. Qual?		<input type="checkbox"/> Poço
Outros animais compartilham o pasto:	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim: Qual?	
Conhecimento de <i>Fasciola hepatica</i> :	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim	
Observação direta			
Nível de tecnificação do sistema de produção:	<input type="checkbox"/> Alto	<input type="checkbox"/> Médio	<input type="checkbox"/> Baixo
Distância das pastagens até a fonte de água natural presente:	<input type="checkbox"/> < 50 metro		<input type="checkbox"/> > 50 metros ou inexistente
Tipo de topografia das pastagens:	<input type="checkbox"/> Relevo plano		<input type="checkbox"/> Relevo plano / montanhoso
Presença de moluscos <i>Lymnaea</i> :	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Local de coleta:			

ANEXO 2 – Relatório de ensaios – Resultado da identificação de moluscos do gênero *Lymnaea* enviados ao Laboratório de Helminologia e Malacologia Médica da Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisa René Rachou, MG.



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisa René Rachou
Laboratório de Helminologia e Malacologia Médica
referenciamoluscos@cpqrr.fiocruz.br



Relatório de ensaios

Número do Laudo: 211-13

Recebimento da amostra: 15/10/13

Solicitante: Ruth Massote Dracz

Endereço: Universidade Federal de Minas Gerais; Av. Antônio Carlos, 6627. Laboratório de Helminologia Veterinária. ICB/ Bloco E4. Sala 163. Bairro: Pampulha CEP:----

Município/Estado: Belo Horizonte-MG

Tel/Fax: 8571-7824 / 9198-0327

Email: rutinhamd@yahoo.com.br

Origem da(s) Amostra(s)

Município/Estado: São José da Lapa / MG.

Coletor: Ruth Massote Dracz

Data da coleta: 22/08/13

Local da coleta:

Ponto 1: Rodovia Mg 424 S/n Km 16. (código 01/0)

Ponto 2: Rodovia Mg 424 S/n Km 16. (código 02/0)

(-) Moluscos terrestres (X) Moluscos límnicos (X) Material vivo (-) Material fixado

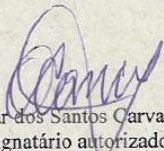
Ponto de coleta	Identificação taxonômica do molusco	Exame parasitológico		
		Nº de moluscos examinados	Nº de moluscos positivos	Agente etiológico
01	<i>Lymnaea columela</i> (<i>Pseudosuccinea columela</i>)	-	-	-
02	<i>Lymnaea columela</i> (<i>Pseudosuccinea columela</i>)	-	-	-

Observações: --

Metodologia: Identificação morfológica (Carvalho OS, Passos LKJ, Mendonça CLGF, Cardoso PCM, Caldeira RL 2008. Moluscos Brasileiros de Importância Médica. Belo Horizonte, Fiocruz/Centro de Pesquisas René Rachou, 86p.)

- Este laudo somente poderá ser reproduzido em sua forma integral.
- O presente laudo é válido apenas para a(s) amostra(s) descrita(s) acima, não sendo extensivo a quaisquer outras amostras.
- A análise da(s) amostra(s) foi realizada nas dependências do Centro de Pesquisa René Rachou.

Belo Horizonte, 27/11/13


Omar dos Santos Carvalho
Signatário autorizado

LHMM SR-07 Anexo A Rev13 Página 1 de 1

Av. Augusto de Lima, 1715, CEP 30190-002, Belo Horizonte - MG - Brasil
TEL: (31) 3349 7746 - FAX: (31) 3295 3115 - www.cpqrr.fiocruz.br

ANEXO 3 – Artigo publicado na Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, descrevendo casos autóctones de bovinos e bubalinos infectados por *Fasciola hepatica* nos municípios de São José da Lapa e Pedro Leopoldo, Minas Gerais.

Autochthonous infection of buffaloes and cattle by *Fasciola hepatica* in Minas Gerais, Brazil

Infecção autóctone de búfalos e bovinos por *Fasciola hepatica* em Minas Gerais, Brasil

Ruth Massote Dracz¹; Walter dos Santos Lima¹

¹Laboratório de Helminologia Veterinária, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil

Received May 6, 2014
 Accepted June 25, 2014

Abstract

Fasciola hepatica is a digenetic trematode that parasitizes the bile ducts of different species of vertebrate hosts. In Brazil, this parasitosis is expanding and occurrences have been reported in the southern, southeastern, central-western and northeastern regions. This study aimed to report the first case of naturally infection of buffaloes by this parasite in the state of Minas Gerais. A total of 250 stool samples, 176 from cattle and 74 from buffaloes, from the districts of São José da Lapa and Pedro Leopoldo, were examined. Also, 402 snails of the genus *Lymnaea* were collected on the same farms and the viability of the eggs from naturally infected buffaloes and cattle and the susceptibility of the snails to infection were tested. A total of 54 animals were found to be positive, 33 cattle (18.75%) and 21 buffaloes (28.37%), and two molluscs showed immature forms of *F. hepatica*. In experimental infection of specimens of *Lymnaea*, cercariae were obtained through spontaneous elimination from the 57th day post-infection onwards. The importance of this first case report can be emphasized because it confirms that this parasite is being dispersed in municipalities in this state that had previously been considered to be unaffected.

Keywords: *Fasciola hepatica*, buffaloes, epidemiology, cattle.

Resumo

Fasciola hepatica é um trematódeo digenético que parasita os ductos hepáticos de diferentes espécies de hospedeiros vertebrados. No Brasil, essa parasitose encontra-se em expansão e a sua ocorrência tem sido descrita nas regiões Sul, Sudeste, Centro-oeste e Nordeste. Esse trabalho objetivou relatar o primeiro caso de búfalos naturalmente infectados no estado de Minas Gerais. Um total de 250 amostras de fezes, sendo 176 de bovinos e 74 de búfalos, provenientes dos municípios de São José da Lapa e Pedro Leopoldo foram examinadas. Também foram coletados 402 moluscos do gênero *Lymnaea* nas propriedades estudadas e a viabilidade dos ovos oriundos dos búfalos e bovinos naturalmente infectados e a susceptibilidade do molusco a infecção foi testada. Um total de 54 animais apresentavam-se positivos sendo 33 bovinos (18,75%) e 21 bubalinos (28,37%) e dois moluscos apresentaram formas imaturas de *F. hepatica*. Na infecção experimental dos exemplares de *Lymnaea*, foram obtidas cercarias eliminadas espontaneamente a partir do 57º dia pós infecção. Ressalta-se a importância desse primeiro relato de caso, pois certifica a dispersão do parasito em municípios antes considerados indenes no Estado.

Palavras-chave: *Fasciola hepatica*, búfalos, epidemiologia, gado.

Introduction

Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758) is a digenetic trematode of the family Fasciolidae that shows cosmopolitan distribution and parasitizes the hepatic ducts of different species of vertebrate hosts. In Brazil, occurrences of this parasite have been reported in the southern, southeastern, central-western and northeastern regions, parasitizing cattle, sheep, buffaloes and wild animals such as coypus and capybaras (SILVA SANTOS et al., 1992; CUNHA et al., 2007;

BELLATO et al., 2009; LIMA et al., 2009; CARNEIRO et al., 2010; BENNEMA et al., 2014). Human cases have also been reported in the southern, central-western, southeastern, northeastern and northern regions, with the largest number of cases in the southern and southeastern regions respectively (MAS-COMA et al., 1999; PILE et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2007).

Fasciolosis can cause major economic losses in parasitized herds because of reduced productivity of milk and meat, growth retardation in young animals, rejection of livers in slaughterhouses, abortions, mortality and expenditure on controlling this parasitosis (LIMA et al., 2009).

*Corresponding author: Walter dos Santos Lima
 Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil
 e-mail: wlima@icb.ufmg.br

The increasing geographical dispersion of *Fasciola hepatica* in Brazil is due to trade and transfer of parasitized animals from areas where the disease is enzootic to locations that are unaffected but have favorable epidemiological conditions. Among these favorable conditions is the presence of snails of the genus *Lymnaea*, which are intermediate hosts for *F. hepatica*. Thus, such conditions also include the climatic and environmental factors that provide a suitable habitat for these snails, such as high humidity and adequate temperature and rainfall (LIMA et al., 2009; ALVES et al., 2011; MARTINS et al., 2012).

This study aimed to report on the spread of the parasite in the state of Minas Gerais and also provides the first report of naturally infected buffaloes in regions that had been considered to be unaffected.

Methods

Area of study

This study was conducted in the municipalities of São José da Lapa (latitude 19° 70' 57.2" south; longitude 43° 97' 47.6" west) and Pedro Leopoldo (19° 37' 12" south; 44° 2' 38" west), which are in the middle metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. These municipalities are lie within the basin of the Velhas river, and some of its tributaries, such as Córrego do Carranca, Ribeirão das Neves and Ribeirão da Mata, pass through several farms in the region, thus offering favorable epidemiological conditions for maintenance of the cycle of *Fasciola hepatica*.

Furthermore, the study area had a history of seven locally-reared adult buffaloes from which, after slaughtering, the livers were condemned due to infection by this parasite. Based on these data, fecal samples were collected from animals on the farm concerned and from neighboring farms, to search for other cases of infection.

Parasitological examinations of cattle and buffaloes

Nine farms drained by the streams Córrego do Carranca and Ribeirão da Mata were selected. On these farms, stool samples were collected directly from the rectum of each animal over the age of 12 months. The samples were collected in properly labeled plastic bags, packed in an insulated box and transported to the Veterinary Helminthology Laboratory, Federal University of Minas Gerais, where they were processed in accordance with the technique of Girão and Ueno (1982) in order to quantitatively and qualitatively diagnose *F. hepatica* eggs.

Molluscs

Searches for snails of the genus *Lymnaea*, an intermediate host for *F. hepatica*, were also conducted on these farms, on the banks of Córrego do Carranca and Ribeirão da Mata and on aquatic plants in these streams. Water tanks and drinking troughs used by the animals were also inspected when present. The specimens

found were transported to the laboratory and dissected under a stereoscopic microscope to investigate the presence of larval stages of the parasite. Among the molluscs collected, ten of them were separated out and kept in the laboratory for breeding. These specimens were kept in plastic vats containing dechlorinated water and fed with lettuce.

Viability of eggs coming from naturally infected cattle and buffaloes and susceptibility of L. columella collected on the farms studied, to infection by Fasciola hepatica

To evaluate the viability of the eggs of *F. hepatica* eliminated by naturally infected cattle and buffaloes, eggs recovered from these hosts were kept in petri dishes in an oven at 27 °C for incubation. After 13 days, the dish containing the eggs was placed under a spotlight for 1 hour, for the miracidia to hatch. Forty-eight molluscs of size 5 mm, which were obtained from the first generation of molluscs that had been collected on the farms, were used for this experimental infection. The specimens of *Lymnaea* were individually placed in the wells of a cell culture plate, each containing 2 ml of dechlorinated water and two miracidia. The snails were kept on the plates for a period of 24 hours. They were then transferred to plastic vats under the same conditions as described above. Starting 50 days after infection, the walls and bottom of the vat were inspected daily under a microscope, to search for cercariae and metacercariae eliminated by the snails.

Results and Discussion

A total of 250 stool samples was collected: 176 from cattle and 74 from buffaloes. The fecal examination showed that a total of 54 animals were positive for *Fasciola hepatica* eggs: 33 cattle (18.75% of the samples) and 21 buffaloes (28.37% of the samples). The number of *F. hepatica* eggs eliminated in four grams of feces, shown through analysis using the technique of Girão and Ueno (1982), ranged in the cattle from 1 to 84 eggs and in the buffalo from 2 to 330 eggs. The percentage of positive animals also varied between the farms studied, as shown in Table 1.

Several similar studies have been conducted describing buffaloes that were naturally infected with *F. hepatica*. Pile et al. (2001) made the first report on this parasite in young and adult buffaloes in the municipality of Marica, state of Rio de Janeiro, with a positivity rate of 2.5% among the 120 samples analyzed.

The highest prevalence rates found were recorded by Marques and Scroferneker (2003) in a study conducted in the state of Rio Grande do Sul. In an analysis on slaughtered animals, they found a prevalence of 10.34% among 377 livers from cattle and 20% among 105 livers from buffaloes infected with *F. hepatica*. Carneiro et al. (2010) reported natural infection by *F. hepatica* in buffaloes for the first time in the south of the state of Espírito Santo, with a positivity rate of 46.67% among 15 samples. These authors also reported that infected cattle and sheep were present on the farm, along with *L. columella*, but no examination of infection in snails was performed.

Table 1. Total number of fecal samples collected from cattle and buffalo on the farms studied, number of positive samples for *Fasciola hepatica* eggs and the percentage (%) positivity in each farm.

Farm	Species studied	Total number of samples collected	Positive samples for <i>F. hepatica</i> eggs	% positive animals in each farm
1	buffalo	19	19	100%
2	buffalo	26	1	3.84%
3	buffalo	29	1	3.44%
4	bovine	19	3	18.75%
5	bovine	37	5	13.51%
6	bovine	45	7	15.55%
7	bovine	44	6	13.63%
8	bovine	24	10	41.66%
9	bovine	7	2	28.57%

Lima et al. (2009) studied occurrences of *F. hepatica* in cattle in 120 municipalities in the state of Minas Gerais, from which a total of 6.255 fecal samples and 492 molluscs *Lymnaea* were collected. Among the municipalities studied, 16 showed positive animals. Among the molluscs collected, four were found to be naturally infected with *F. hepatica*, thus demonstrating the spread of fasciolosis in this state. Their data corroborate the present paper.

Alves et al. (2011) reported on the distribution of and factors connected with *Fasciola hepatica* infection in cattle in southern Espírito Santo and analyzed 50 farms selected in ten municipalities of the state. These authors observed a frequency of fasciolosis of 21.33% and emphasized that the area studied presented great epidemiological importance due to its geographical position covering two significant hydrographic basins. The rivers of these basins flow through the states of Espírito Santo, Minas Gerais and Rio de Janeiro, thus allowing the disease to spread not only in Espírito Santo but also in other states.

Bennema et al. (2014) reported on occurrences of *Fasciola hepatica* in cattle in Brazil and observed that in Minas Gerais all the infected municipalities were located in the south of the state. Our results showed the presence of the parasite in the center-south region of the state, again confirming the expansion of fasciolosis.

In relation to the intermediate host of *F. hepatica*, snails of the genus *Lymnaea* were only found on five of the nine farms investigated in this study. A total of 402 specimens were collected, of which two had immature forms of the parasite (0.5%). Other studies have been conducted to estimate the natural rate of infection of *Lymnaea* by *F. hepatica*, since the presence of the intermediate host in the environment is a fundamental factor in the epidemiology of fasciolosis. Coelho and Lima (2003) studied the natural infection rate of molluscs in the municipality of Itajubá, Minas Gerais, and found prevalences ranging from 0.9 to 5.2%. Their rates were higher than what was found in the present study (0.5%), but it is noteworthy that the work of Coelho and Lima (2003) was conducted in an area that is considered endemic for the parasite. Gomes et al. (2002) also examined naturally infected snails, and reported an infection rate of 5.22% among 134 specimens collected in the municipality of Goytacazes, in the state of Rio de Janeiro.

In our experimental infection of specimens of *Lymnaea*, cercariae of *F. hepatica* were found to be spontaneously eliminated from the 57th day post-infection onwards, thus demonstrating the viability of the eggs and the susceptibility of these snails to infection. These data corroborate other authors' observations (BORAY, 1996;

SOUZA et al., 2002), with spontaneous elimination of cercariae at close to 60 days post-infection.

The high prevalence found in buffaloes in the present study was because the farms had ponds and flooded areas with which the buffaloes had constant direct contact and where *Lymnaea* molluscs were present. It is important to emphasize all these factors, as well as the presence of infected native vertebrate hosts and environmental conditions favorable towards maintaining the cycle, as also reported by several authors (COELHO; LIMA, 2003; LIMA et al., 2009). This first reported case of naturally infected indigenous buffaloes and cattle in the state of Minas Gerais, in areas previously considered to be free from infection stands out in importance because it shows that this parasite has become dispersed to municipalities in this state that previously were considered to be unaffected.

Acknowledgments

This research was supported by the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel Support (CAPES), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Pró-Reitoria de Pesquisa of Universidade Federal de Minas Gerais. WSL and RTF are supported by CNPq fellowships.

References

- Alves DP, Carneiro MB, Martins IVF, Bernardo CC, Donatele DM, Pereira OS Jr, et al. Distribution and factors associated with *Fasciola hepatica* infection in cattle in the south of Espírito Santo State, Brazil. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2011; 17(3): 271-276. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992011000300006>
- Bellato V, Souza AP, Sartor AP, Haubold LP, Veiga N, Centenaro F. Ocorrência de *Fasciola hepatica* na população de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e em bovinos (*Bos taurus*) no município de Timbó, SC. *Rev Cienc Agrovet* 2009; 8(1): 66-70.
- Bennema SC, Scholte RGC, Molento MB, Medeiros C, Carvalho OS. *Fasciola hepatica* in bovines in Brazil: data availability and spatial distribution. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2014; 56(1): 35-41. PMID:24553606. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652014000100005>
- Boray JC. Studies on the relative susceptibility of some lymnaeids to infection with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* and on the adaptation of *Fasciola* spp. *Ann Trop Med Parasitol* 1996; 60(1): 114-124.

- Carneiro MB, Bernardo CC, Calais A Jr, Alves DP, Pereira OS Jr, Martins IVF. *Fasciola hepatica* em búfalos (*Bubalus bubalis*) no sul do Espírito Santo. *Rev Bras Med Vet* 2010; 32(2): 89-91.
- Coelho LHL, Lima WS. Population dynamics of *Lymnaea columella* and its natural infection by *Fasciola hepatica* in the State of Minas Gerais, Brazil. *J Helminthol* 2003; 77(1): 7-10. PMID:12590657. <http://dx.doi.org/10.1079/JOH2002138>
- Cunha FOV, Marques SMT, Mattos MJT. Prevalence of slaughter and liver condemnation due to *Fasciola hepatica* among sheep in the state of Rio Grande do Sul, Brazil 2000 and 2005. *Parasitol Latinoam* 2007; 62(3-4): 188-191.
- Girão ES, Ueno H. Técnica de Quatro tamises para o diagnóstico coprológico quantitativo da fasciolose dos ruminantes. *Pesq Agropec Bras* 1982; 20(8): 905-912.
- Gomes FF, Oliveira FCR, Pile EA, Lopes CWG. Estabelecimento de foco de fasciolose hepática em propriedade do município de Campos dos Goytacazes no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2002; 11(2): 53-56.
- Lima WS, Soares LRM, Barçante JMP, Barçante TA, Guimarães MP. Occurrence of *Fasciola hepatica* (LINNAEUS, 1758) infection in Brazilian cattle in the State of Minas Gerais. *Rev Bras Parasitol Vet* 2009; 18(2): 27-30. PMID:19500457. <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01802006>
- Marques SMT, Scroferneker ML. *Fasciola hepatica* infection in cattle and buffaloes in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Parasitol Latinoam* 2003; 58(3-4): 169-172.
- Martins IVF, de Avelar BR, Pereira MJS, da Fonseca AH. Application of a geographical information system approach for risk analysis of fascioliasis in southern Espírito Santo State, Brazil. *Geospat Health* 2012; 6(3): 87-93.
- Mas-Coma MS, Esteban JG, Bargues MD. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bull World Health Organ* 1999; 77(4): 340-346. PMID:10327713 PMID:PMC2557647.
- Oliveira AA, Nascimento AS, Santos TAM, Carmo GMI, Dimech CPN, Alves RMS, et al. Prevalence survey and factors associated with fascioliasis in the Municipality of Canutama, State of Amazon, Brazil. *Epidemiol Serv Saúde* 2007; 16(4): 251-259.
- Pile E, Gazeta G, Santos JAA, Coelho B, Serra-Freire NM. Ocorrência de fascioliasis humana no município de Volta Redonda, RJ, Brasil. *Rev Saúde Pública* 2000; 34(4): 413-414. PMID:10973164. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102000000400017>
- Pile E, Santos JAA, Pastorello T, Vasconcelos M. *Fasciola hepatica* em búfalos (*Bubalus bubalis*) no município de Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2001; 38(1): 42-43. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-95962001000100008>
- Silva Santos IC, Scaini CJ, Rodrigues LAF. *Myocastor coypus* (Rodentia: Capromyidae) como reservatório silvestre de *Fasciola hepatica* (Lineu, 1758). *Rev Bras Parasitol Vet* 1992; 1(1): 27-30.
- Souza CP, Magalhães KG, Passos LKJ, Santos GCP, Ribeiro F, Katz N. Aspects of the maintenance of the life cycle of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea columella* in Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(3): 407-410. PMID:12048573. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000300023>

ANEXO 4 – Artigo publicado na Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, descrevendo a infecção natural de capivara por *Fasciola hepatica* no município de Confins, Minas Gerais.

Occurrence of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) in capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (Linnaeus, 1766) in Minas Gerais, Brazil

Ocorrência de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) em capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (Linnaeus, 1766) em Minas Gerais, Brasil

Ruth Massote Dracz¹; Vinicius Marques Antunes Ribeiro¹; Cintia Aparecida de Jesus Pereira¹;
 Walter dos Santos Lima^{1*}

¹Laboratório de Helminologia Veterinária, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil

Received December 17, 2015
 Accepted February 29, 2016

Abstract

Fasciola hepatica is a parasite that affects the hepatic ducts of several species of domestic and wild vertebrates, causing huge economic losses to livestock rearing worldwide. Reports on occurrences of *F. hepatica* in capybaras are an important epidemiological aspect of this disease, since these rodents can be a source of contamination for other animals and humans. In the present study, conducted in a rural area of the municipality of Confins, Minas Gerais, fresh feces from capybaras were collected from the ground near a lagoon at the edge of the Ribeirão da Mata river. These were examined using the technique of four metal sieves. *F. hepatica* eggs were recovered. This trematode species was confirmed by observing morphological characteristics and measuring the eggs recovered from the capybara feces, and through experimental infection of *Lymnaea columella* (Say, 1817) by miracidia from these eggs and subsequent infection of C57/BL06 mice with metacercariae originating from these infected mollusks. The data suggest the occurrence of natural cycle of *F. hepatica* in this region and provide a warning that expansion of the geographical distribution of this parasite by means of this rodent is possible. It is therefore important to adopting measures for epidemiological control of this helminthiasis.

Keywords: Fascioliasis, epidemiology, wildlife animals, rodents, *Hydrochoerus hydrochaeris*.

Resumo

Fasciola hepatica é um parasito que acomete os ductos hepáticos de diversas espécies de vertebrados domésticos e silvestres, causando grandes perdas econômicas na pecuária global. Relatos sobre a ocorrência de *F. hepatica* em capivaras constituem um importante aspecto epidemiológico dessa parasitose, visto que esses roedores podem ser fonte de contaminação para outros animais e humanos. No presente estudo realizado em área rural do município de Confins, Minas Gerais, foram coletadas no solo, próximo à lagoa marginal do rio Ribeirão da Mata, fezes frescas de capivaras. Essas foram examinadas pela técnica de quatro tamises metálicos. Foram recuperados ovos de *F. hepatica*. A confirmação da espécie desse trematódeo foi realizada por observação de características morfológica e mensuração dos ovos recuperados das capivaras, infecção experimental de moluscos *Lymnaea columella* (Say, 1817) por miracidios oriundos desses ovos e pela infecção de camundongos C57/BL06 com metacercárias oriundas desses moluscos infectados. Os dados obtidos sugerem a ocorrência do ciclo natural de *F. hepatica* na região, alertando que a expansão da distribuição geográfica deste parasito por esse roedor é possível. Portanto, é importante a adoção de medidas para o controle epidemiológico desta helmintíase.

Palavras-chave: Fasciolose, epidemiologia, animais de vida selvagem, roedores, *Hydrochoerus hydrochaeris*.

*Corresponding author: Walter dos Santos Lima, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Bloco E4, Sala 163, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil. e-mail: wlima@icb.ufmg.br

Introduction

Fasciola hepatica (Trematoda: Digenea) is a parasite in the family Fasciolidae that affects the liver ducts of sheep, cattle, buffaloes, goats, rodents and other mammals, and even humans. It is responsible for fasciolosis, which is a very important disease within veterinary and human medicine, given that it is a zoonosis.

In veterinary medicine, it constitutes a serious problem for domestic ruminant rearing and causes large losses and economic harm arising from condemnation of livers in slaughter houses, falls in milk, meat and wool productivity, growth retardation in young animals, decreased fertility, abortions, secondary bacterial infections, death of animals and high costs due to the medication that is used to control the parasitosis (DAEMON & SERRA-FREIRE, 1992; LIMA et al., 2009).

This disease has worldwide distribution, and in Brazil the largest enzootic area is located in the south, followed by the southeast and central-west. In the state of Minas Gerais, parasite records have arisen in isolation, and new foci have been reported, thus indicating the possibility of emergence of new areas of transmission and spreading of fasciolosis (LIMA et al., 2009; DRACZ & LIMA, 2014).

The economic and epidemiological importance of fasciolosis has led to greater numbers of studies directed towards ruminants of economic importance, such as cattle and sheep, or towards human infection. Nevertheless, there have been reports of infection by this disease in other animal species such as rodents, which suggests that they can possibly be considered to be reservoirs for the parasite cycle.

Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) are the largest species of rodent found in Brazil and are also a definitive host of *F. hepatica* (SANTARÉM et al., 2006; EL-KOUBA et al., 2008). This rodent and its parasite present coincident distribution in lentic aquatic environments such as the backwaters of rivers, lakes, reservoirs and marshes. These environments are an essential factor in the development of the fluke cycle. Capybaras present adaptability to disturbed habitats, and this facilitates their survival in large urban centers and other regions subject to anthropic activity (FERRAZ et al., 2009). In addition to these factors, the defecation habits of capybaras in aquatic environments contribute towards maintaining the natural life cycle of the parasite. This makes it difficult to control this zoonosis, given that the mollusk genus *Lymnaea*, which is an intermediate host of *F. hepatica*, often occurs in these environments.

In some regions of the state of Minas Gerais, cattle and other animal species coexist with the presence of capybaras. Thus, it is important to study *F. hepatica* in capybaras, since these rodents can become infected and act as reservoirs, which would make it difficult to control the disease. The present work was carried out to study occurrences of *F. hepatica* in the population of capybaras in the municipality of Confins, Minas Gerais.

Materials and Methods

Study area

Stool samples were collected from capybaras living at a lagoon on the edge of the Ribeirão da Mata river, in the rural area of the municipality of Confins, which is located in the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais (19° 40' 50.34" S, 43° 58' 23.42" W).

Collection and examination of feces

Eleven samples of fresh feces from capybaras were collected from the ground near a lagoon on the edge of the river, in the area of study, all on the same day in the morning. The feces were individually wrapped in labeled plastic bags, packed in an insulated box with ice and transported to the Veterinary Helminthology Laboratory of the Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais.

In order to recover *F. hepatica* eggs, the feces were processed and analyzed in accordance with the technique described by Girão & Ueno (1985). The eggs found were counted and measured under a microscope.

Viability of eggs, miracidia and metacercariae

The eggs that were found through examining the feces were transferred to Petri plate containing dechlorinated water, with the aid of a Pasteur pipette. The plate was kept in an incubator at 27 °C. From the seventh day onwards, the plates were examined daily under a stereoscopic microscope at 40x magnification, in order to follow the formation and development of miracidia. Plates containing eggs with developed miracidia were placed under a spotlight (60 W) at a distance of 50 cm for a period of one hour, to stimulate hatching.

The miracidia that hatched were used to infect *L. columella* mollusks that had been reared in our laboratory. Infection was performed using 24-well culture plates (Kartel SPA). The mollusks were placed individually into wells containing 2 mL of dechlorinated water and three miracidia were added using a Pasteur pipette. The plates were kept under a focused light of 60 W at a distance of 50 cm for a period of 24 hours. After infection, the mollusks were kept in plastic tubs with dechlorinated water and were fed with lettuce. On the 50th day after infection, the mollusks were removed from the tubs and were placed in individual Petri plates lined with plastic film (Parafilm® Laboratory Film, American National Can™) in order to facilitate recovery and encystment of the metacercariae. The plates were exposed to a focused light of 60 W at a distance of 50 cm for 5 hours a day, to stimulate elimination of cercariae and formation of metacercariae.

The viability of the metacercariae was evaluated through experimental infection of seven female mice (C57/BL06) that were eight weeks old. Each mouse was infected orally with three metacercariae. These were suspended in dechlorinated water and administered with the aid of a syringe, by means of needle gavage.

The procedure for experimental infection of the mice had previously been submitted for approval to the Ethics Committee for

Use of Animals (CEUA) of the Federal University of Minas Gerais. It was approved under the protocol number CEUA181/2015.

Starting on the 30th day after infection, feces were collected from the mice every day and were processed by means of the Girão & Ueno technique (1985) for quantitative and qualitative diagnosing of *F. hepatica* eggs.

Results and Discussion

Through examination of the 11 capybara feces samples in the laboratory, one sample (9.1%) yielded an average of 16 eggs of *F. hepatica* per gram of feces examined. From the eggs recovered, 20 were separated and measured under a microscope. These presented an average length of 142.74 μm (SD \pm 7.63) and width of 75.74 μm (SD \pm 7.83), as shown in Table 1.

Regarding the viability of the eggs recovered from capybara feces, formation and hatching of active miracidia from all eggs was observed after incubation. These miracidia were used to experimentally infect 50 *L. columella* mollusks.

Spontaneous elimination of cercariae was observed starting on the 57th day after infection of the mollusks. These encysted on the plastic film that covered the inner surface of the Petri plate. A total of 2,403 metacercariae were obtained from the 13 surviving mollusks (26%).

These metacercariae obtained were used to experimentally infect mice. On the 77th day after infection, 60% of the mice were still alive and eggs were observed in their feces. Egg elimination

continued to be observed until three months after infection, at which time the mice were necropsied and adult parasites were recovered from the bile ducts and gallbladder.

This confirmation of the viability of the eggs recovered from the capybaras and of the cycles in *Lymnaea* and in mice demonstrates that capybaras are definitive hosts for *F. hepatica*. This suggests that capybaras have real importance in maintaining the wild cycle. It is important to remember that capybaras disperse into different groups, to take possession of territory and search for food, while always moving near water courses, and that they can act as disseminators of fasciolosis. On the farm where the present study was conducted, capybaras were living in the same area as cattle and humans, all with free access to the lagoon where the feces sampling was carried out. The mollusc *L. columella* is also present at this location, thus facilitating encounters between the miracidia that hatched from the eggs and the intermediate host and leading to cattle infection.

The average size of the *F. hepatica* eggs observed in this study was similar to what was described by El-Kouba et al. (2008), who reported that the dimensions of eggs obtained from capybaras were 138.56 μm in length and 72.96 μm in width. In the present study, it was also observed that the average number of *F. hepatica* eggs released per gram of feces from the capybaras was lower than the average number of eggs released by cattle and buffaloes present in municipalities neighboring the area of this study, as reported by Dracz & Lima (2014). The capybara population is increasing, and therefore these rodents can participate in transmission and maintenance of the *F. hepatica* cycle in the study area.

Santarém et al. (2006) reported occurrences of adult parasites in the liver of an adult capybara that was found dead in a park in the city of Presidente Prudente, state of Sao Paulo, Brazil. The parasite was identified as *F. hepatica* and, during the autopsy, liver lesions characteristic of infection by this parasite were observed. However, no eggs were recovered from the feces.

El-Kouba et al. (2008) studied the presence of *F. hepatica* eggs in capybaras in three parks in Curitiba, state of Paraná - Brazil, and found that the prevalence ranged from 0 to 100% in samples collected from the populations living in these parks.

Bellato et al. (2009) studied occurrences of this parasite in populations of cattle and capybaras on 19 farms in the municipality of Timbó, Santa Catarina - Brazil. They reported occurrences of 18.12% in cattle and 8.96% in capybaras that were naturally infected by *F. hepatica*. They pointed out that the difference in these results could be explained by the diversity of environmental conditions, management and surveying at the sites where the studies were conducted.

The population of capybaras in Minas Gerais has shown significant growth over recent years. Advancement of farming into areas close to wildlife habitats provides contact between human populations, domestic animals and wild animals, and it facilitates maintenance of this disease between hosts and environments and thus establishment of new parasite-host relationships (EL-KOUBA et al., 2008).

This is the first report on capybara naturally infected by *F. hepatica* in the state of Minas Gerais. It emphasizes the importance of epidemiological studies in this region, with the aim of searching for new foci of fasciolosis. Such studies may

Table 1. Mean and standard deviation of length and width measurements (μm) on *Fasciola hepatica* eggs recovered from the feces of a naturally infected capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), in the municipality of Confins, Minas Gerais.

<i>Fasciola hepatica</i> eggs	
Length (μm)	Width (μm)
130.94	80.23
142.46	70.32
142.98	73.38
135.70	71.66
138.94	76.02
146.89	66.13
147.62	66.55
137.82	75.24
149.68	81.46
156.64	91.03
143.54	79.12
139.41	75.12
146.73	81.36
139.12	69.45
130.49	91.74
144.64	85.02
146.47	78.41
151.36	67.04
154.15	70.65
129.21	65.04
142.74 \pm 7.63	75.74 \pm 7.83

contribute towards adoption of control measures that are more comprehensive, with the aim not only to treat cattle and other domestic ruminants, but also to treat and implement control measures among wildlife that can act as reservoirs for this emerging zoonosis in this state.

References

- Bellato V, Souza AP, Sartor AA, Veiga LPHN, Centenaro F. *Fasciola hepatica* occurrence in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) and bovines (*Bos taurus*) in Timbó, SC, Brazil. *Rev Ciênc Agrovet* 2009; 8(1): 66-70.
- Daemon E, Serra-Freire NM. Estudos da relação custo-benefício em parasitologia: uma proposta de análise. *Parasitol Dia* 1992; 16(1-2): 59-62.
- Dracz RM, Lima WS. Autochthonous infection of buffaloes and cattle by *Fasciola hepatica* in Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2014; 23(3): 413-416. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612014054>. PMID:25271466.
- El-Kouba MMAN, Marques SMT, Pilati C, Hamann W. General aspects of Fascioliasis and Endoparasitic diseases in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris* Linnaeus, 1766) from three parks in the State of Paraná, Brazil. *Vet Foco* 2008; 6(1): 4-15.
- Ferraz KMPMB, Peterson AT, Scachetti-Pereira R, Vettorazzi CA, Verdade LM. Distribution of capybaras in an agroecosystem, Southeastern Brazil, based on ecological niche modeling. *J Mammal* 2009; 90(1): 189-194. <http://dx.doi.org/10.1644/07-MAMM-A-338.1>.
- Girão ES, Ueno H. Técnica de quatro tamises para o diagnóstico coprológico quantitativo da fasciolose dos ruminantes. *Pesq Agropec Bras* 1985; 20(8): 905-912.
- Lima WS, Soares LRM, Barçante TA, Guimarães MB, Barçante JMP. Occurrence of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) infection in Brazilian cattle in the State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2009; 18(2): 1-4. <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01802006>. PMID:19602308.
- Santarém VA, Tostes RA, Alberti H, Sanches OC. *Fasciola hepatica* in capybara. *Acta Trop* 2006; 98(3): 311-313. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.05.004>. PMID:16774732.

CAPITULO 3

Aspectos parasitológicos, hematológicos e imunológicos de ovinos da raça Santa
Inês experimentalmente infectados por *Fasciola hepatica*.

1. Introdução

A *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) é dentre os parasitos que acometem os ovinos, um dos de maior importância econômica, pois pode levar à redução do peso, da produção de carne e leite, condenação de fígados em matadouros, além dos gastos com o controle da parasitose (Lima et al., 2009; Trivilin, 2010). Esse trematódeo parasita os ductos biliares de diversas espécies de mamíferos, inclusive o homem, constituindo um problema de saúde pública, por ser uma zoonose.

A susceptibilidade ou resistência do hospedeiro frente a infecção por *F. hepatica* está associada a características bioquímicas do parasito, carga parasitária, estado nutricional, idade e a eficiência da resposta imune dos animais parasitados (Thorpe, 1965; Sinclair 1967; Boray 1969). As interações estabelecidas com o hospedeiro vertebrado envolvem habilidades imunomoduladoras, capazes de interferir com os mecanismos inflamatórios que ocorrem durante a infecção, de modo a conduzir à sobrevivência de ambos, parasito e hospedeiro (Rojo-Vázquez et al., 2012).

As diversas interações que ocorrem nas infecções por *F. hepatica* com seu hospedeiro vertebrado, sugerem a atuação de um sistema integrado entre a resposta humoral e celular, com uma grande diversidade de componentes. Este sistema ocorre com a participação e interação de diferentes tipos celulares, com a produção de moléculas e proteínas, como as citocinas, mediadoras de diversos processos biológicos essenciais, que atuam na regulação da comunicação intercelular e, principalmente, podem atuar desempenhando um importante papel na modulação das interações entre o parasito e células do hospedeiro. Estas interações e modulações são importantes por se tratarem de mecanismos de escape do parasito e mecanismos de respostas do hospedeiro responsáveis pela ocorrência e manutenção da infecção. O comportamento da imunidade humoral e celular frente a antígenos do parasito tornou-se um importante aliado na elucidação da resposta imunológica do hospedeiro (Zhang et al., 2005; Trivilin, 2010).

Este capítulo teve como objetivo de avaliar aspectos imunológicos de ovinos na fase aguda e crônica da infecção por *F. hepática*.

2. Material e métodos

2.1 Ovinos e infecções experimentais

Todo o procedimento para infecção experimental dos ovinos foi previamente submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovado sob o número de protocolo CEUA 15/2016.

Para avaliar aspectos imunológicos de ovinos na fase aguda e crônica da infecção por *F. hepatica*, foram utilizados 16 ovinos da raça Santa Inês, criados livres de infecção, com oito meses de idade, identificados com brincos plásticos numerados. O experimento foi realizado em uma fazenda localizada no município de Curvelo – Minas Gerais (18° 52' 25.7" de Latitude Sul, 44° 36' 32.4" de Longitude Oeste).

Os ovinos foram divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo A formado por 8 animais infectados com 150 metacercárias para cada animal; grupo B formado por 8 animais não infectados – grupo controle.

A infecção dos ovinos foi individual e por via oral, onde os animais receberam as metacercárias suspensas em água desclorada direto na cavidade oral utilizando-se seringas descartáveis com capacidade de 10 ml.

Os animais foram mantidos em duas baias coletivas, separados de acordo com o grupo, recebendo forragem verde picada, feno, sal mineral e água à vontade. Além do alimento “volumoso” os animais receberam diariamente, 500 gramas de ração com 18% de proteína bruta.

2.2 Avaliação parasitológica

Aos 30, 60, 90, 120 e 150 dias pós infecção (dpi) foram coletadas fezes dos animais infectados para avaliar as contagens de ovos por gramas de fezes (OPG).

As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de animal, em saco plástico devidamente identificado, armazenadas em caixa de isopor com gelo e transportadas ao laboratório de Helminologia Veterinária do ICB/UFMG.

Para o exame coprológico, foram pesadas de cada amostra, 4 gramas de fezes. Adicionado 30 ml de água e homogeneizado. Em seguida, a mistura foi passada através de um conjunto de quatro tamises, dispostos uns sobre os outros, na sequência de ordem

100, 180, 200 e 250 malhas/polegadas, com aberturas de 174, 96, 87 e 65 μm , respectivamente. Os três primeiros tamises permitem a passagem de ovos de *F. hepatica*, retendo fibras fecais, e o último tamis retém os ovos, juntamente com fibras fecais finas. A lavagem foi realizada em água corrente e o material retido no último tamis (250 malhas/polegada) foi recolhido em um copo plástico, utilizando um jato de água no sentido oposto ao da lavagem. Após dez minutos em decantação, foi retirado o sobrenadante com auxílio de uma pipeta de Pasteur, e o material decantado, transferido para uma placa de Petri, examinado e contados em um estereomicroscópio no aumento de 40X.

2.3 Avaliação hematológica

Para a avaliação hematológica, nos intervalos de 0, 30, 60, 90, 120 e 150 dias pós infecção, os animais do grupo A e B foram contidos e coletados 5 ml de sangue em tubo à vácuo com o anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a 10% direto da veia jugular.

Foi realizado hemograma completo em contador hematológico automático (Modelo Bio – 2900 Vet – Bioeasy).

Foram confeccionados esfregaços sanguíneos e realizadas as contagens diferenciais de linfócitos, monócitos, eosinófilos, neutrófilos e basófilos. Duas contagens de 100 células foram realizadas em campos diferentes e a média desses valores foi obtida (Ferreira Neto et al., 1982).

Também foi obtido plasma do restante da amostra coletada de cada ovino. Os tubos foram centrifugados a 200 g por 10 minutos. Alíquotas de 300 μL foram separadas e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior utilização na identificação de anticorpos IgG presentes na circulação.

Nesses intervalos também foram coletados 20 ml de sangue em tubos heparinizados para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

2.4 Avaliação imunológica

Foram avaliados a produção da citocina TGF- β 1 e de óxido nítrico em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de

todos os animais do experimento e a produção de anticorpos IgG específicos para antígeno bruto e antígeno de excreção e secreção de *F. hepatica*, nos intervalos de 0, 30, 60, 90, 120 e 150 dias após infecção (dpi).

2.4.1 Obtenção e separação de células mononucleares do sangue periférico

Após a coleta de sangue dos ovinos nos tubos heparinizados, estes foram armazenados em caixa de isopor com gelo e transportados ao laboratório para serem processados.

Os 20 ml de sangue de cada amostra foram transferidas individualmente para tubos de 50 ml de polipropileno (Falcon 2074, BD Biosciences, EUA) identificados, e lentamente sobre o sangue, foram colocados 10 ml de solução de Ficoll-Hypaque (Histopaque[®] 1.077, Sigma, EUA). Os tubos foram centrifugados a 200 g por 40 minutos em temperatura ambiente. O anel contendo as células mononucleares, formado na interface entre plasma e eritrócitos, foi coletado, transferido para outro tubo de 50 ml e lavado por duas vezes a 806 g por 10 minutos com meio RPMI 1640 (Sigma, EUA).

Ao final, as células foram ressuspensas para 1 ml de meio RPMI, e contadas em câmara de Neubauer, na diluição de 1:20 em Solução de Azul de Turks (Sigma, EUA). O número total de células por ml foi obtido por média do número de células nos quatro quadrantes x 20 (fator de diluição) x 10⁴ (fator de correção da câmara).

2.4.2 Preparação de antígeno de excreção e secreção de *Fasciola hepatica*

F. hepaticas utilizadas na produção dos antígenos foram obtidas de fígados de bovinos naturalmente infectados durante o abate realizado no Abatedouro FrigoVitor do Município Pedro Leopoldo, MG.

Foram utilizados quinze parasitos adultos, que foram lavados três vezes com PBS estéril 1X para remoção do sangue e bile. Foram acondicionados em tubos Falcon[®] de 50 ml (BD Biosciences, EUA) contendo PBS estéril 1X e incubados a 37°C over night. Os parasitos foram retirados, e o tubo centrifugado por 10 minutos a 200 g. A quantidade de proteínas nas preparações antigênicas foi dosada pelo uso de kit comercial BCA (Pierce BCA kit, Pierce, USA), realizado conforme as instruções do fabricante. O sobrenadante foi então separado em alíquotas de 500 µL e armazenado a -20°C até o uso.

2.4.3 Preparação de antígeno bruto solúvel de *Fasciola hepatica*

Após a preparação do antígeno de excreção e secreção, os parasitos foram macerados mecanicamente com PBS estéril 1X. Após completa maceração, o material foi sonicado (potência de 20 W, frequência de 20 ondas ultrassonográficas por segundo, amplitude 4, potência máxima) em aparelho de ultrassom em 05 ciclos de 1 minuto com intervalos de 1 minuto. Durante todo o processo, o tubo contendo os parasitos foi mantido em banho de gelo. O material foi centrifugado a 1.200 rpm por 10 minutos. O sedimento descartado e o sobrenadante, filtrado em um filtro Millex HV de 0,25µm (Millipore®). A quantidade de proteínas nas preparações antigênicas foi dosada pelo uso de kit comercial BCA (Pierce BCA kit, Pierce, USA), realizado conforme as instruções do fabricante. Alíquotas de 500 µL dos antígenos brutos prontos foram armazenadas a - 20 °C até o seu uso.

2.4.4 Cultura de células mononucleares do sangue periférico

Aproximadamente 500.000 PBMCs (obtidas conforme o item 2.4.1) foram incubadas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, EUA) suplementado com 2% de antibiótico penicilina e estreptomicina (Invitrogen, EUA), 1,6% de L-Glutamina (Synth, Brasil) e 10% de Soro Fetal Bovino (Cutlab, Brasil) durante 72 horas na presença e ausência de antígeno bruto e de antígenos de excreção e secreção de *F. hepatica*, em placas de cultura de fundo chato de 24 poços (Falcon®, BD lab., EUA) em uma atmosfera úmida a 37° C e 5% de CO₂.

Após a incubação, o conteúdo de cada poço foi coletado com pipeta, transferido para um eppendorf identificado e centrifugado a 200 g a temperatura ambiente por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro eppendorf e armazenado a -80° C até sua utilização. Às células do fundo do eppendorf foi adicionado 200 µL de Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Brasil) e foram armazenadas a -80° C, para posterior utilização em outros experimentos.

2.4.5 Dosagem de TGF-β1 em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico

Para determinar a produção de TGF- β 1 em ovinos durante a infecção por *F. hepatica*, sobrenadantes de culturas de PBMCs foram analisados pelo teste imunoenzimático ELISA utilizando o Kit comercial TGF β 1 E_{MAX}®ImmunoAssay System (Promega).

Primeiramente as amostras passaram por um tratamento ácido, onde foi adicionado 1 μ l de 1 N HCl para cada 50 μ l de amostra, até o pH estar em 3.0 ou menor. Após incubação de 15 minutos em temperatura ambiente, foi adicionado 1 μ L de 1 N NaOH para cada 50 μ L de amostra, até o pH estar em 7.6. Esse tratamento ácido é necessário para que o TGF- β 1 fique em sua forma bioativa, que é imunorreativa e detectável pelos anticorpos monoclonais e policlonais de TGF- β 1 do Kit utilizado.

Após esse tratamento, os ensaios foram realizados segundo protocolo sugerido pelo fabricante.

2.4.6 Dosagem de óxido nítrico em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico

A dosagem de óxido nítrico, no sobrenadante das culturas de PBMCs, foi realizada pela Reação de Griess através da mensuração da concentração de nitrito (NO₂⁻) (HIBBS et al., 1988; ROPERT et al., 2001).

Os sobrenadantes coletados das cultuas de PBMCs (item 2.4.4) foram retirados do freezer e uma alíquota de 50 μ L retirada e transferida para uma placa de 96 poços (Falcon®, BD lab., EUA). Foram acrescentados 50 μ L do reagente de Griess em cada poço. Após 10 minutos de reação, à temperatura ambiente, a leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm.

O Reagente de Griess foi preparado no momento da adição aos poços a partir das seguintes soluções: solução 1: 1% de sulfanilamida em 2,5% H₃PO₄; solução 2: 0,1% Nedd (Dihidrocloreto de N-(1-naftil)-etilenodiamina) em 2,5% de H₃PO₄. Essas soluções foram preparadas previamente e mantidas a 4° C em frascos protegidos da luz. A concentração de nitrito foi calculada utilizando-se uma curva padrão com uma concentração conhecida de nitrito de sódio (NaNO₂) em diferentes concentrações.

2.4.7 Dosagem de anticorpos IgG no plasma dos ovinos

A resposta humoral foi avaliada utilizando-se plasma dos ovinos dos grupos A e B. O ensaio de ELISA indireta foi utilizado para a pesquisa dos anticorpos IgG específicos para os antígenos bruto solúvel e antígenos de excreção e secreção de *F. hepatica*.

As concentrações ideais dos antígenos, plasma e dos anticorpos específicos utilizados foram previamente testadas com plasma de animais positivos e negativos para a infecção pelo parasito. Inicialmente realizou-se a padronização da técnica titulando-se o antígeno nas concentrações 0,25µg; 0,5µg; 1µg e 2 µg. O plasma nas diluições 1:1000; 1:2000; 1:5000; 1:8000 e 1:16000 e o conjugado nas diluições 1:2000; 1:4000; 1:8000; 1:10000 e 1:15000.

Após a padronização da técnica foi realizado o ELISA final. As placas de 96 poços e fundo plano (Falcon®, BD lab., EUA) foram sensibilizadas com 1µg dos antígenos diluídos em 50 µL de água Milli-Q. Em seguida a placa foi colocada em estufa a 37°C para secar. Após esse intervalo foram adicionados 150 µL por poço de solução de bloqueio de sítios inespecíficos (PBS-SFB 5%) seguindo de incubação por 1 hora em estufa a 37 °C. O conteúdo dos poços foi descartado por inversão da placa. Em seguida foram adicionados os plasmas dos ovinos infectados (nos intervalos de 0, 30, 60, 90, 120 e 150 dpi) e controles diluídos 1:5000 em solução de lavagem; 100 µL desta solução foram colocados em cada um dos poços e a placa foi incubada por 1 hora em estufa a 37 °C. A placa foi lavada três vezes, e anticorpos marcados com enzima peroxidase específicos para IgG de ovinos (Bethyl Laboratories, EUA) foram colocados na diluição 1:2000 e a placa foi incubada em estufa a 37 °C por 1 hora. O excesso do conjugado foi retirado por uma série de três lavagens. A reação foi revelada pelo uso de substrato cromogênico contendo peróxido de hidrogênio (Sigma, EUA) e OPD (O-phenylenediamine, Sigma, EUA). A densidade óptica da reação foi mensurada por um leitor de microplacas (SpectraMax, Molecular Devices, EUA), a um comprimento de onda de 492 nm e os resultados expressos em valores de absorbância.

2.5 Alterações macroscópicas e microscópicas

Durante o período experimental um ovino infectado morreu aos 97 dias após infecção. Foi realizada a necropsia e o fígado examinado.

Foram realizadas observações macroscópicas em relação a coloração, consistência, forma, deposição de fibrina, presença de pontos de necrose e fibrose, espessamento, calcificação e obstrução dos ductos biliares. Além da coleta de parasitos presentes nos ductos e na vesícula biliar.

Fragmentos de 2 cm foram coletados, fixados em formol 10% tamponado e processados de acordo com técnica de rotina para inclusão em parafina. Após a fixação o material foi desidratado em álcool e diafanizado em xilol. Os fragmentos foram incluídos em parafina, realizados cortes de cinco micrômetros. As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (Luna, 1968) e observadas em microscópio óptico nas objetivas de 04, 10, 20, 40 e 100 X.

2.6 Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc, EUA).

Para a avaliação hematológica foi utilizado o teste 2way ANOVA para analisar as alterações decorrentes da infecção nos ovinos nos diferentes intervalos de coleta e ao longo do tempo. Para analisar as médias de produção de TGF- β 1, óxido nítrico e IgG nos grupos de ovinos infectados e controle, foi utilizado o teste ANOVA avaliando os diferentes pontos de amostragem.

Todos os testes são considerados significativos quando apresentarem um valor de $P \leq 0,05$. Os outliers foram detectados utilizando-se o Teste de Grubbs.

3. Resultados

3.1 Avaliação parasitológica

O exame de fezes dos ovinos experimentalmente infectados realizado aos 0 e 30 dias após infecção (dpi) mostrou que nenhum dos animais liberava ovos do parasito nas fezes. No exame realizado aos 60 dpi todos os animais já apresentavam ovos do parasito nas fezes. Na TABELA 1 pode-se observar um aumento gradativo no número de ovos eliminados por grama de fezes (OPG) no grupo de animais infectados nos intervalos de 30, 60, 90, 120 e 150 dpi.

TABELA 1 - Número de ovos por grama de fezes (OPG) dos ovinos experimentalmente infectados por 150 metacercárias de *Fasciola hepatica*, aos 30, 60, 90, 120 e 150 dias após infecção (dpi).

Ovinos	OPG				
	30 dpi	60 dpi	90 dpi	120 dpi	150 dpi
OV1	0	3	116	845	945
OV2	0	4	215	2062	1974
OV3	0	20	127	341	642
OV4	0	16	98	954	846
OV5	0	8	167	741	819
OV6	0	18	142	524	725
OV7	0	11	106	-	-
OV8	0	9	235	714	834
Média ±DP	0±0	11,1±6,3	150,8±50,8	772,6±603,5	848,1±541,8

3.2 Avaliação hematológica

3.2.1 Hemograma

3.2.1.1 Hemácias

No Gráfico 1 encontram-se os valores médios das contagens de hemácias nos grupos infectado (A) e não infectado (B). A partir da segunda coleta, no 30º dia pós infecção, foi observado que o número de hemácias nos grupos de ovinos infectados (Grupo A) começou a reduzir, ficando abaixo do valor encontrado para o grupo de ovinos não infectados (Grupo B). Essa queda foi detectada até o 90º dpi e então houve um aumento nesses valores, os quais se mantiveram estáveis. Houve diferença significativa entre os grupos aos 60 e 90 dpi ($p < 0.001$).

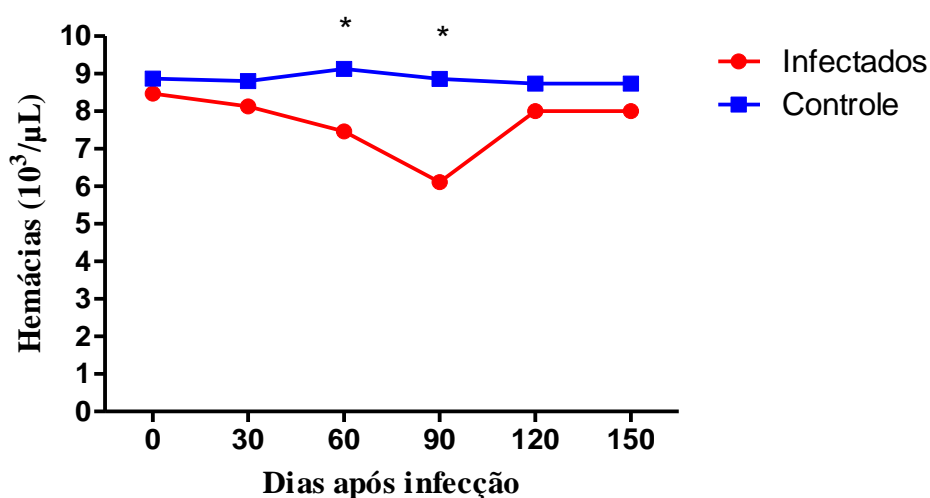


GRÁFICO 1 - Valores médios de hemácias em ovinos infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* (Grupo A) e ovinos não infectados (Grupo B) durante período experimental.

3.2.1.2 Hemoglobina

Os valores médios de hemoglobina do Grupo A (ovinos infectados) foram inferiores aos observados no Grupo B (ovinos não infectados) nos dias posteriores a infecção (GRÁFICO 2). Foi observada uma crescente queda nos valores do Grupo A a partir do 30° dpi, sendo que após o 90° dpi ocorreu um leve aumento, entretanto ainda sendo inferior ao outro grupo. Houve diferença significativa entre os grupos nos intervalos de 30, 60, 90, 120 e 150 dpi ($p < 0.001$).

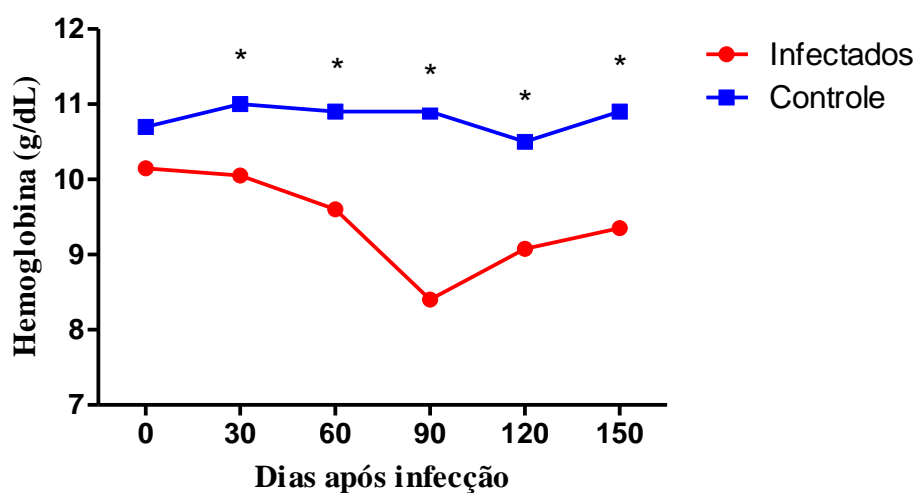


GRÁFICO 2 - Valores médios da concentração de hemoglobina em ovinos infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* (Grupo A) e ovinos não infectados (Grupo B) durante período experimental.

3.2.1.3 Hematócrito

No Gráfico 3 estão representados os valores médios do hematócrito dos grupos experimentais. Os valores médios do Grupo A, ovinos infectados, foram inferiores aos valores médios do grupo de ovinos não infectados, Grupo B, ao longo do experimento, com diferença estatística nos intervalos de 30, 60, 90, 120 e 150 dpi ($p < 0.001$). Os valores médios do grupo B mantiveram-se constantes ao longo do experimento.

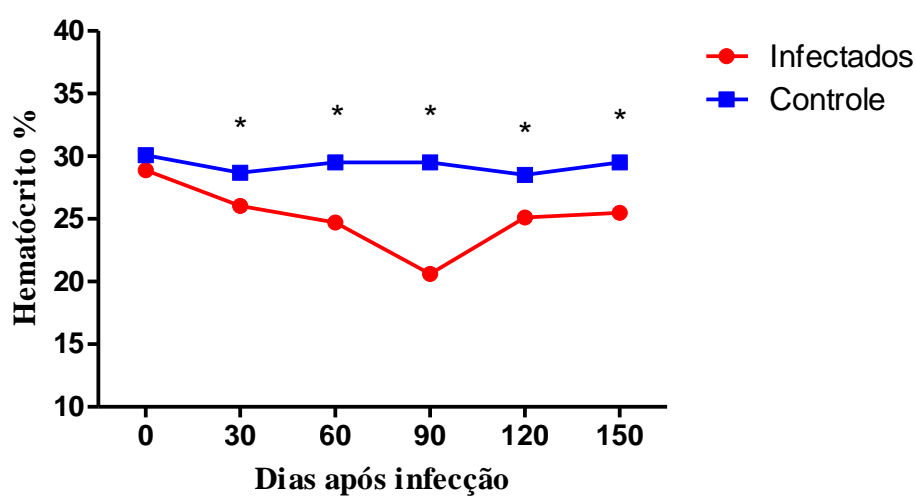


GRÁFICO 3 - Valores médios do hematócrito em ovinos infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* (Grupo A) e ovinos não infectados (Grupo B) durante período experimental.

3.2.1.4 Volume Corpuscular Médio

Os valores do volume corpuscular médio (VCM) dos dois grupos apresentaram pequenas variações ao longo do experimento (GRÁFICO 4). Embora não tenha sido detectada diferença estatística dos valores entre os grupos ($p>0.05$), os ovinos infectados apresentaram leve macrocitose durante o período de acompanhamento.

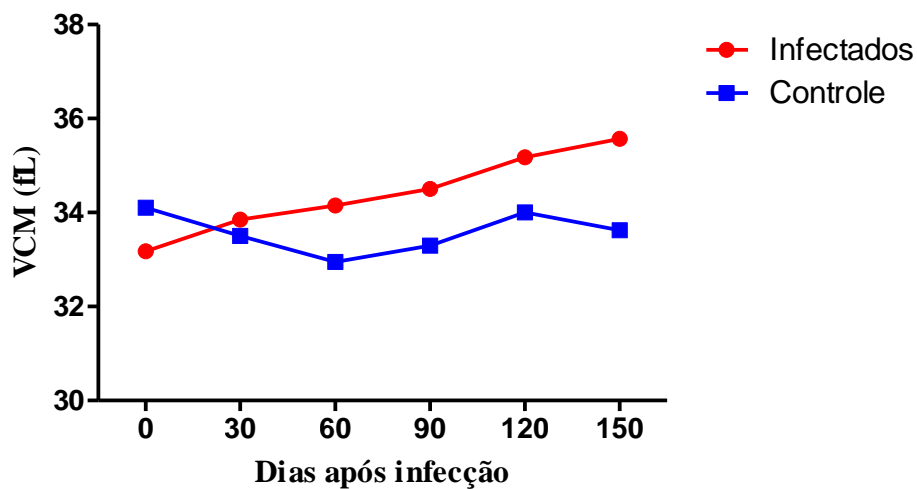


GRÁFICO 4 - Valores do volume corpuscular médio (VCM) em ovinos infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* (Grupo A) e ovinos não infectados (Grupo B) durante período experimental.

3.2.1.5 Concentração Média de Hemoglobina

Os valores da concentração média de hemoglobina (CMH) dos grupos ovinos experimentais (Grupos A e B) estão apresentados no Gráfico 5. A média dos dois grupos foram semelhantes durante a maioria do período experimental, excetuando-se pelos valores do grupo A no intervalo de 90 dpi, onde foi detectado um grande aumento nesse parâmetro com diferença significativa ($p < 0.001$) quando comparada ao grupo B.

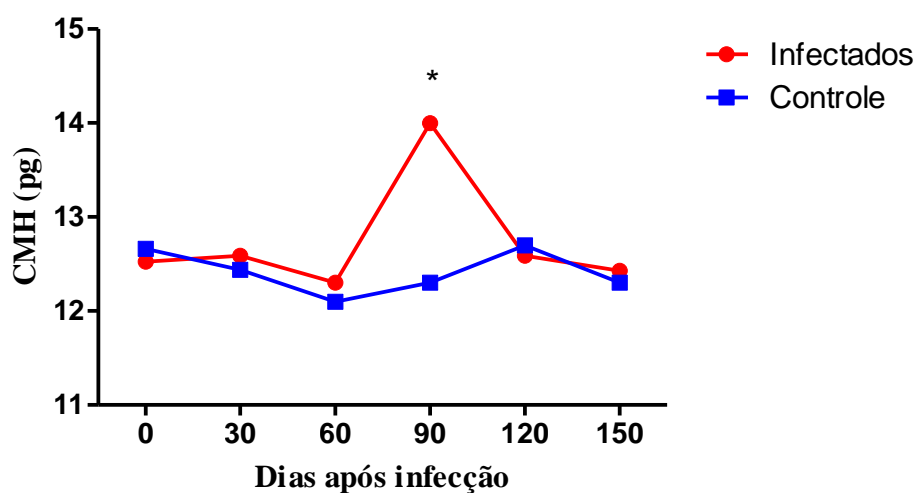


GRÁFICO 5 - Valores da concentração média de hemoglobina (CMH) em ovinos infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* (Grupo A) e ovinos não infectados (Grupo B) durante período experimental.

3.2.1.6 Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

Os valores da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) nos dois grupos experimentais permaneceram sem grandes oscilações ao longo do experimento (GRÁFICO 6). Apenas o grupo A (ovinos infectados) apresentou um grande aumento desses valores no intervalo de 90 dpi, com diferença estatística quando comparado ao grupo B ($p < 0.001$).

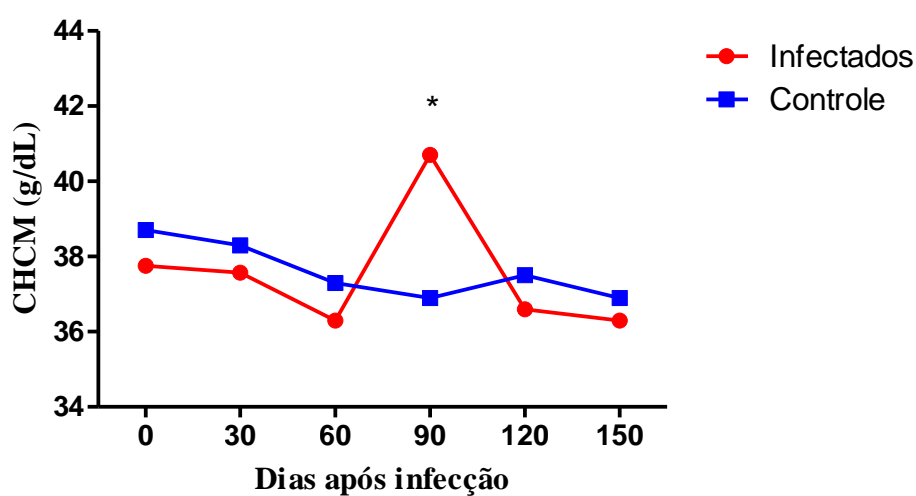


GRÁFICO 6 - Valores da concentração média de hemoglobina (CMCH) em ovinos infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* (Grupo A) e ovinos não infectados (Grupo B) durante período experimental.

3.2.2 Leucograma

3.2.2.1 Contagem Global de Leucócitos

Os valores médios da contagem global de leucócitos dos grupos estão no Gráfico 7. Os valores do grupo de ovinos infectados (Grupo A) permaneceram acima dos valores encontrados para o grupo de ovinos não infectados (Grupo B). Entretanto houve diferença estatística somente no 60º dpi entre os valores do Grupo A com os valores dos Grupos B ($p < 0.01$).

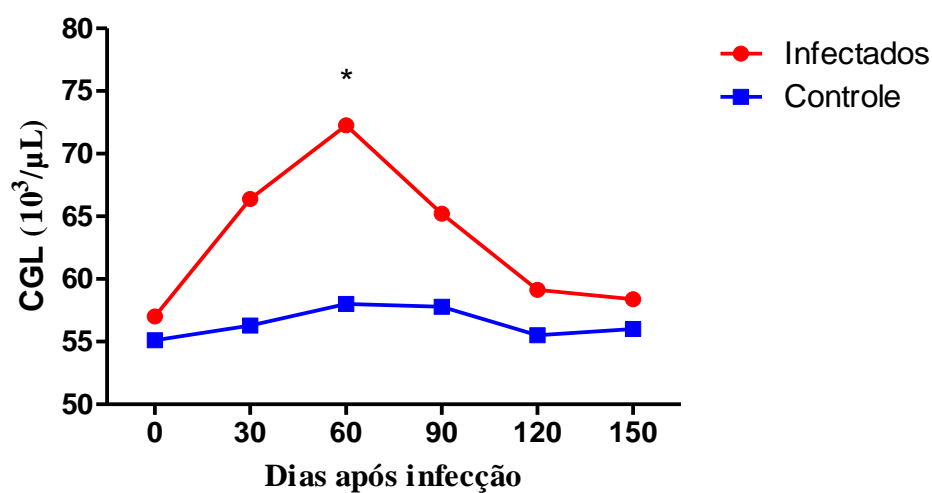


GRÁFICO 7 - Média da contagem global de leucócitos em ovinos infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* (Grupo A) e ovinos não infectados (Grupo B) durante período experimental.

3.2.2.2 Linfócitos

Os valores médios de linfócitos nos grupos A e B estão representados no Gráfico 8. O grupo controle (B) apresentou valores sem grandes oscilações ao longo do período experimental. Enquanto o grupo infectado (A) apresentou um aumento gradativo e constante no número de linfócitos circulantes até o 60º dpi, sendo que no intervalo de 90 dpi esses valores pouco aumentaram mas mantiveram-se elevados. Nos intervalos de 60, 120 e 150 dpi houve diferença estatística entre os grupos ($p < 0.01$).

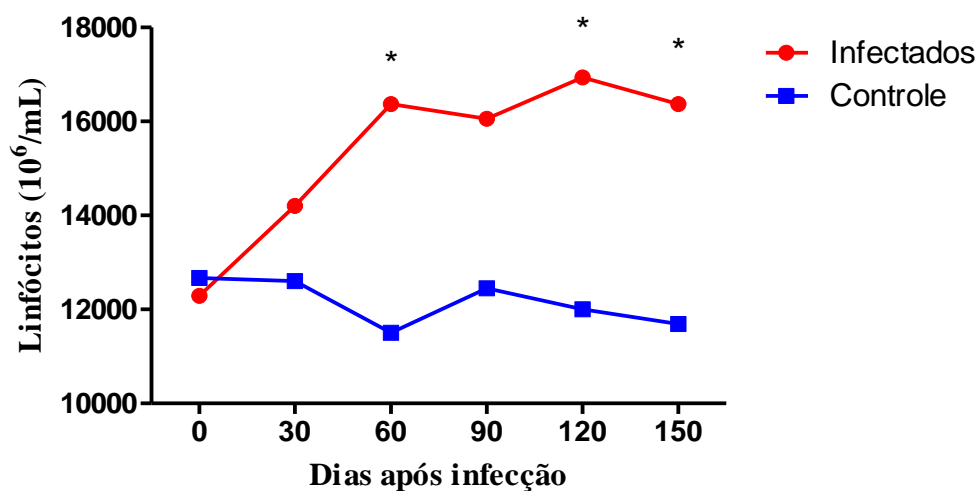


GRÁFICO 8 - Média da contagem global de linfócitos em ovinos infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* (Grupo A) e ovinos não infectados (Grupo B) durante período experimental.

3.2.2.3 Neutrófilos

Os valores médios da contagem global de neutrófilos no grupo de ovinos não infectados (B), mostrou-se constante em todos os pontos de coleta (GRÁFICO 9). Os valores do grupo de ovinos infectados (A), apresentou um aumento gradativo até o 60º dpi, intervalo no qual houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0.05$). Aos 90 dpi houve uma pequena queda nesses valores mas ainda assim, estavam superiores aos do grupo B, e partir de 120 dpi houve novamente um aumento nos valores de neutrófilos circulantes.

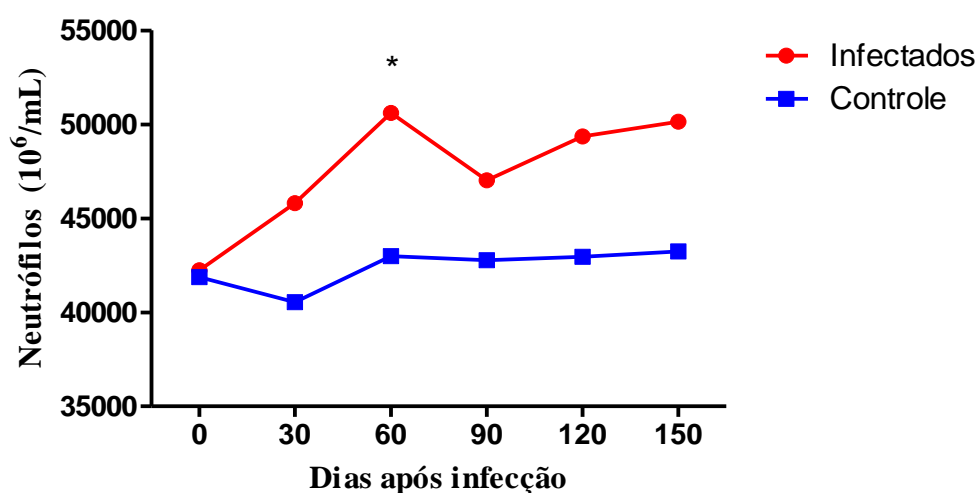


GRÁFICO 9 - Média da contagem global de neutrófilos em ovinos infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* (Grupo A) e ovinos não infectados (Grupo B) durante período experimental.

3.2.2.4 Eosinófilos

O grupo de ovinos infectados apresentou eosinofilia durante todo o período experimental, com valores estatisticamente superiores aos do grupo de ovinos não infectados nos intervalos de 30, 60, 90, 120 e 150 dpi ($p < 0.001$), como demonstrado no Gráfico 10.

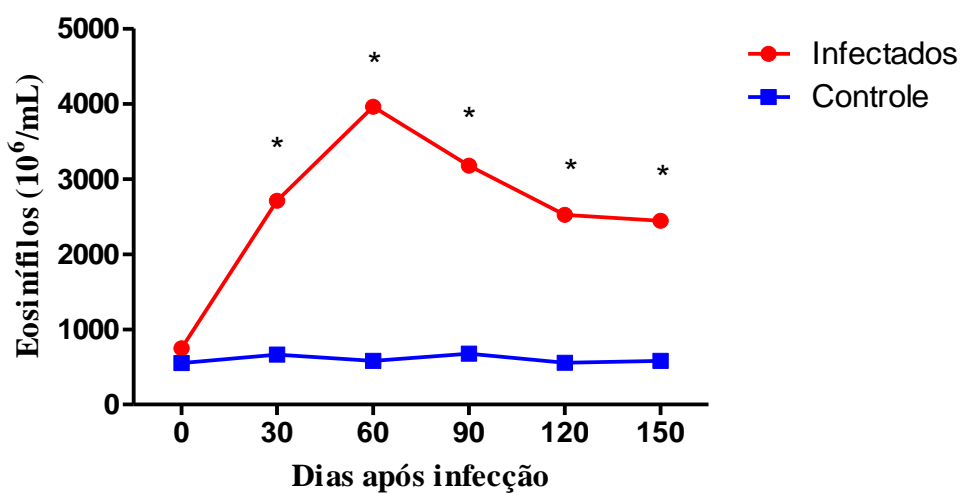


GRÁFICO 10 - Média da contagem global de eosinófilos em ovinos infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* (Grupo A) e ovinos não infectados (Grupo B) durante período experimental.

3.2.2.5 Monócitos

Como demonstrado no Gráfico 11, os valores de monócitos no grupo A (animais infectados) foi significativamente superior aos valores do grupo B (animais não infectados) a partir do 30º dpi ($p < 0.001$).

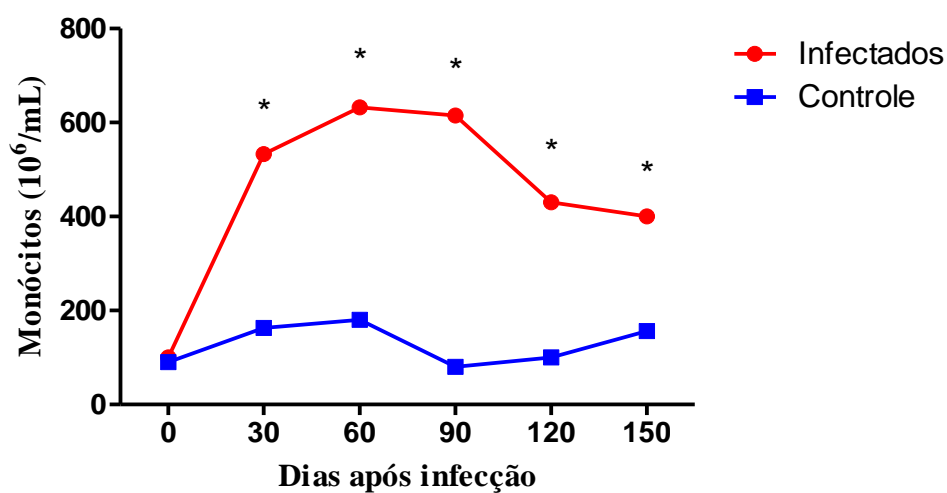


GRÁFICO 11 - Média da contagem global de monócitos em ovinos infectados com 150 metacercárias de *Fasciola hepatica* (Grupo A) e ovinos não infectados (Grupo B) durante período experimental.

3.3 Avaliação Imunológica

3.3.1 Dosagem de TGF- β_1

Ao avaliar a citocina TGF- β_1 produzidas pelas células mononucleares do sangue periférico de ovinos experimentalmente infectados com *F. hepatica*, estimuladas com antígeno bruto do parasito, foi detectado que logo no início da infecção, aos 30 dpi, ocorreu uma grande produção da citocina em resposta ao antígeno do parasito. Esses valores se mantiveram elevados durante todo o período experimental, havendo diferença estatística ($p < 0.0001$) entre o grupo controle (não infectado) e todos os intervalos de avaliação do grupo infectado, com exceção do dia 0 (GRÁFICO 12).

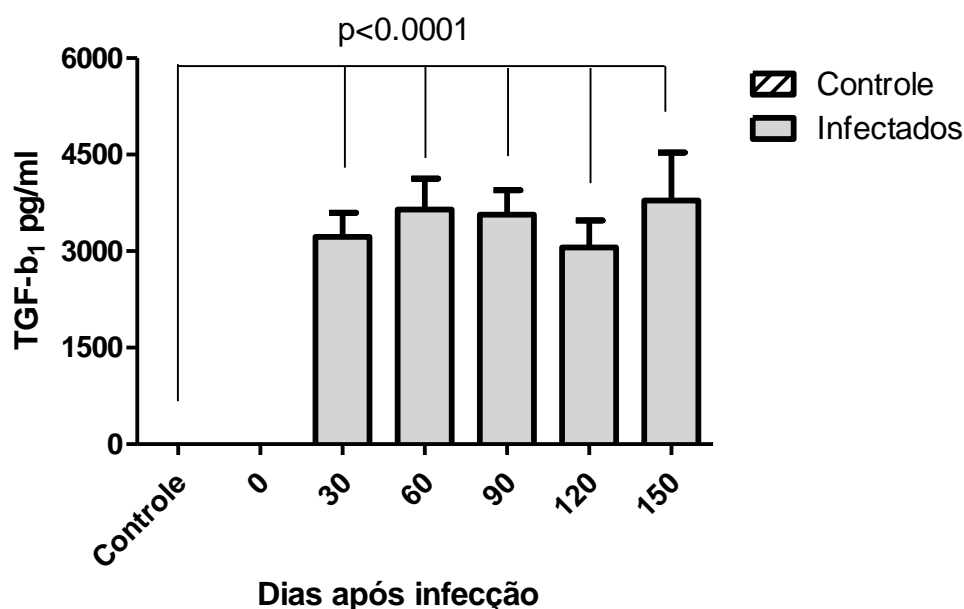


GRÁFICO 12 - Produção da citocina TGF- β_1 em sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico de ovinos experimentalmente infectados com *Fasciola hepatica*, estimuladas com antígeno bruto do parasito.

Quando as células foram estimuladas com antígeno de excreção e secreção do parasito, foi detectada um elevado nível de produção da citocina aos 30° dpi. Os níveis se mantiveram elevados durante todo o período experimental, entretanto pode-se observar dois picos nos dias 60 e 150 dpi. Ao se relacionar esses intervalos de pico da produção da citocina com o ciclo do parasito, esses pontos de avaliação coincidem com a chegada do trematódeo aos ductos biliares e quando as lesões decorrentes do trauma mecânico pela presença do parasito nesses ductos começam a se intensificar, respectivamente. Houve diferença estatística entre os intervalos de 30, 60, 90, 120 e 150 dpi quando comparado ao grupo controle (grupo B) (GRÁFICO 13).

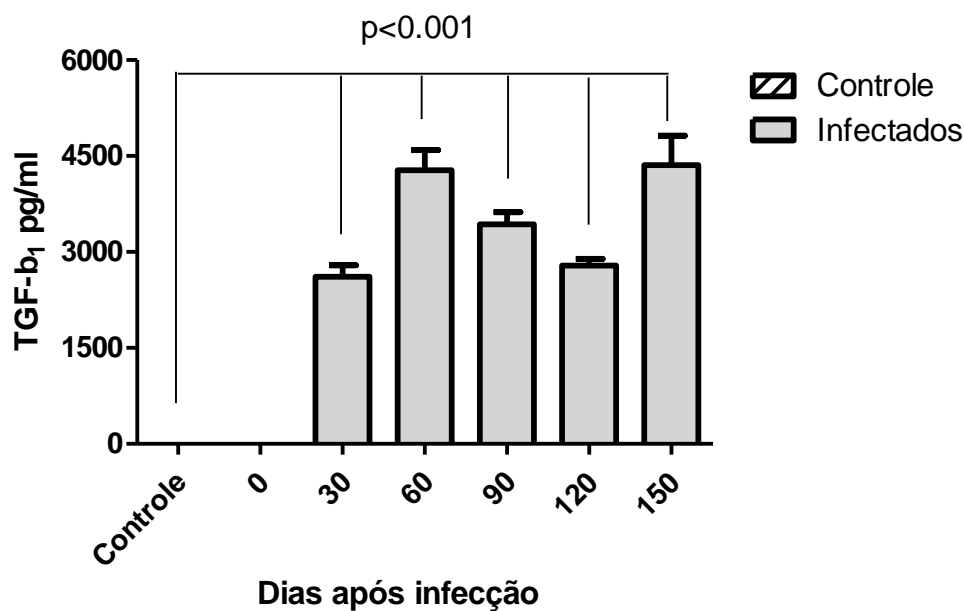


GRÁFICO 13 - Produção da citocina TGF-β₁ em sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico de ovinos experimentalmente infectados com *Fasciola hepatica*, estimuladas com antígeno de excreção e secreção do parasito.

3.3.2 Dosagem de óxido nítrico

Quando as células foram estimuladas com antígeno bruto do parasito, foi observada uma produção gradual de NO_2^- a partir do 30º até os 90 dpi. Aos 120 dpi foi detectada uma queda nesses níveis e posterior aumento novamente aos 150 dpi. Ao se comparar os valores nos animais infectados ao longo do experimento com os animais controles, houve diferença significativa nos intervalos de 90 e 150 dpi ($p < 0.05$) (GRÁFICO 14).

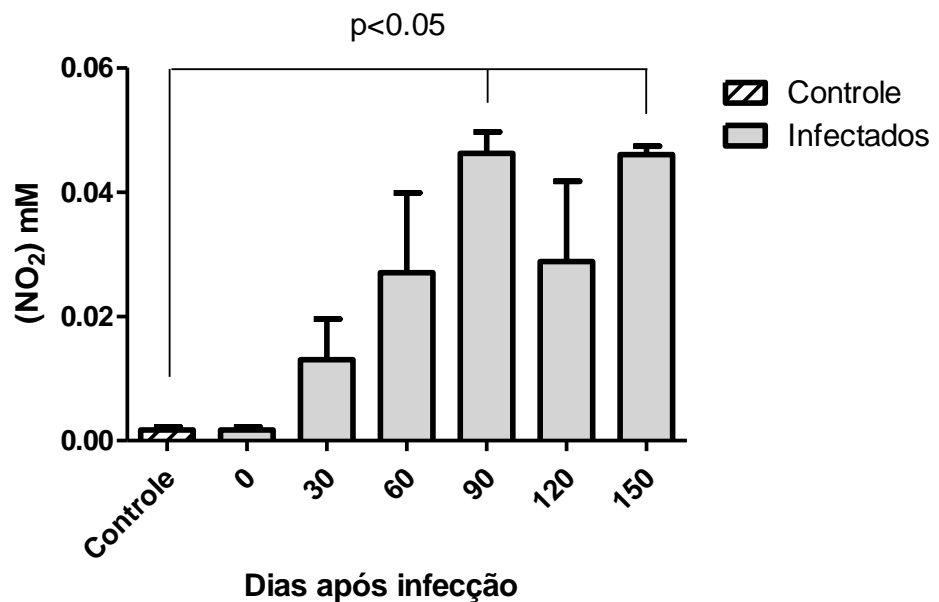


GRÁFICO 14 - Produção de óxido nítrico em sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico de ovinos experimentalmente infectados com *Fasciola hepatica*, estimuladas com antígeno bruto do parasito.

Ao avaliar as células que foram estimuladas com antígeno de excreção e secreção do parasito, também foi detectada uma produção de NO_2^- a partir do 30º dpi, com um pico nos valores aos 90 e 120 dpi, apresentando leve queda aos 150 dpi. Em comparação aos animais controle (Grupo B), houve diferença significativa nos intervalos de 90, 120 e 150 dpi ($p < 0.05$) (GRÁFICO 15).

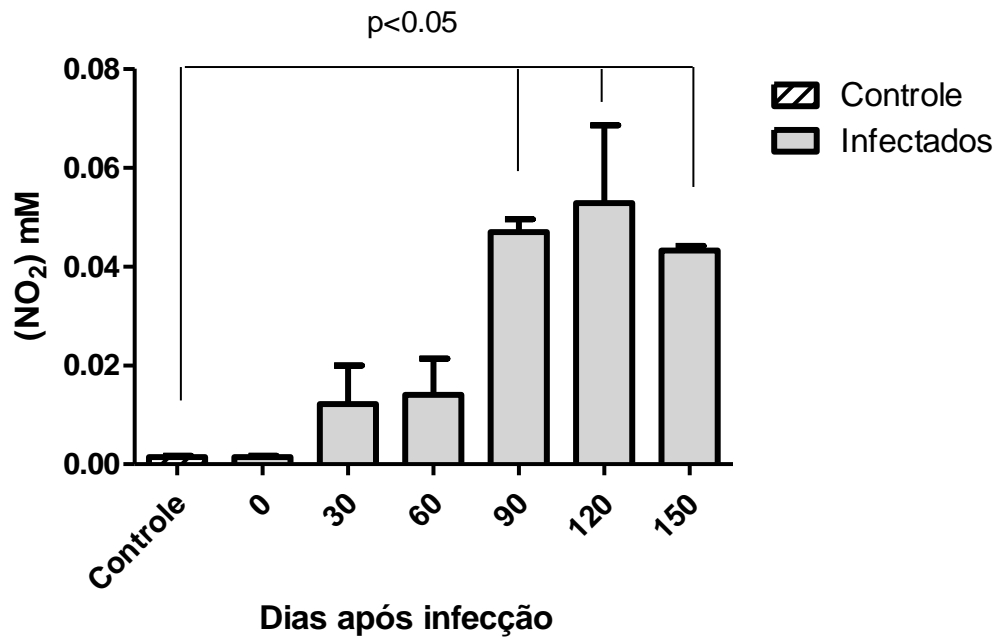


GRÁFICO 15 - Produção de óxido nítrico em sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico de ovinos experimentalmente infectados com *Fasciola hepatica*, estimuladas com antígeno de excreção e secreção do parasito.

3.3.3 Dosagem de IgG no plasma de ovinos

Após a padronização do teste de ELISA, em todos os ensaios realizados foram utilizados os antígenos na concentração de 1 µg por poço das placas, o soro e o conjugado nas diluições de 1:5000 e 1:2000, respectivamente.

Na avaliação dos níveis de anticorpos IgG anti-antígeno bruto do parasito, detectou-se uma produção maior logo no início da infecção, aos 30 dpi. Sendo que esses valores se mantem elevados quando comparados aos valores do grupo controle (ovinos não infectados). Entretanto os níveis do anticorpo circulante apresentam uma queda gradual e constante no decorrer da infecção. Os valores de IgG detectados nos intervalos de 30, 60, 90 e 120 dpi foram estatisticamente superiores ($p < 0.05$) aos observados no controle (GRÁFICO 16).

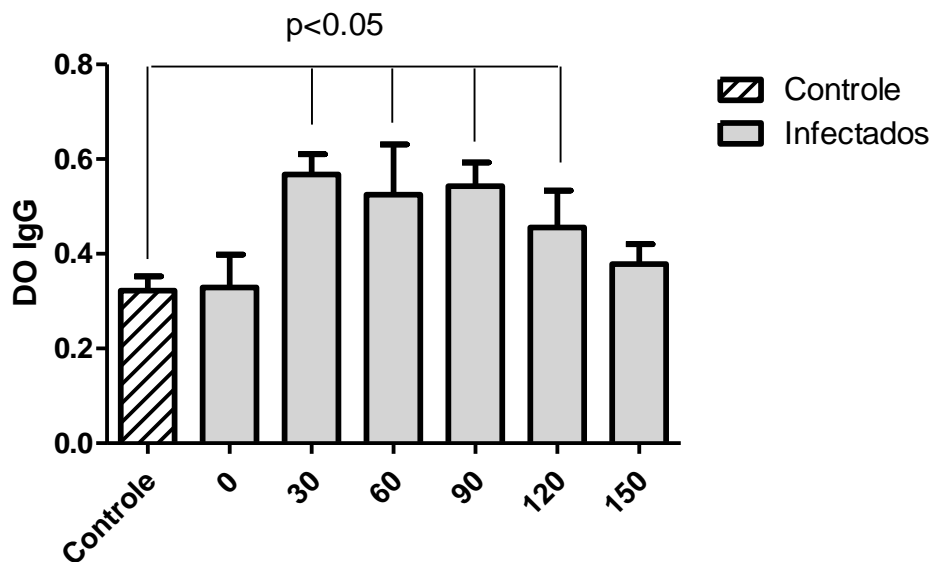


GRÁFICO 16 - Reatividade de anticorpos IgG anti-antígeno bruto de *Fasciola hepatica*, em densidade óptica (DO) no plasma de ovinos infectados e não infectados no período experimental (0 a 150 dias após infecção).

Ao avaliar os níveis de anticorpos IgG anti-antígeno de excreção e secreção do parasito, detectou-se que a partir do 30º dpi os níveis de anticorpos circulantes já são superiores aos do grupo de ovinos não infectados. Entretanto pode-se observar que o pico da produção de IgG ocorre aos 90 dpi, decaindo gradualmente no decorrer da infecção. Os valores de IgG observados nos intervalos de 30, 60, 90 e 120 dpi foram estatisticamente superiores ($p<0.05$) aos observados no controle (GRÁFICO 17).

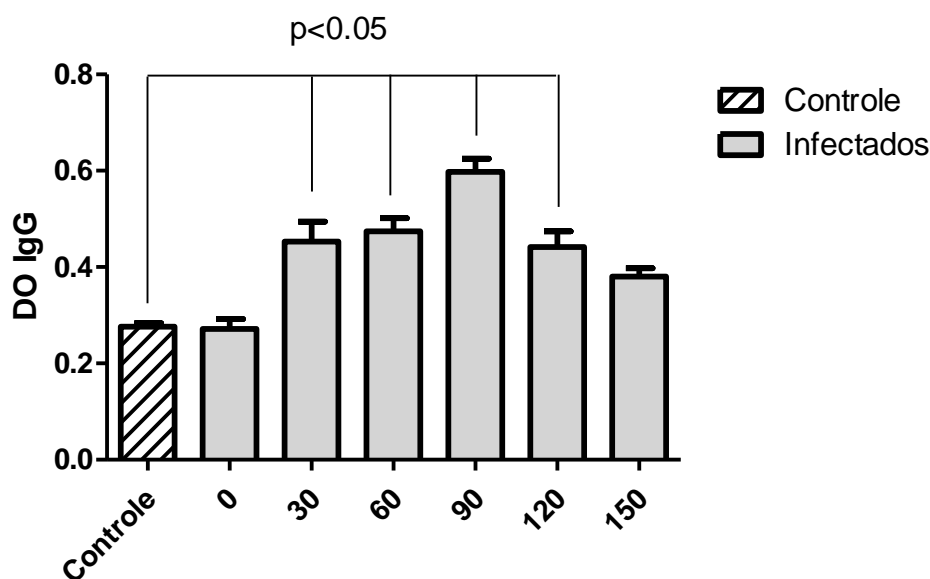


GRÁFICO 17 - Reatividade de anticorpos IgG anti-antígeno de excreção e secreção de *F. hepatica*, em densidade óptica (DO) no plasma de ovinos infectados e não infectados no período experimental (0 a 150 dias após infecção).

Os resultados obtidos nos ensaios de ELISA demonstraram a participação do anticorpo IgG, caracterizando o como um, entre os outros mecanismos, da resposta humoral dos ovinos infectados por *F. hepatica*, atuando principalmente nos primeiros 90 dias da infecção, sendo que após esse período os níveis de anticorpos começam a reduzir para níveis basais.

Também foi observado, ao se comparar os dois estímulos antigênicos, que o nível de IgG circulante, anti-antígeno de excreção e secreção, foi significativamente maior ($p=0.0259$) aos noventa dias pós infecção, período em que os parasitos já migraram pela

cavidade abdominal, alcançaram o fígado perfurando a capsula hepática e instalaram-se nos ductos biliares, atingindo a maturidade e iniciando a postura de ovos.

3.4 Alterações macroscópicas e microscópicas

Macroscopicamente o fígado apresentou aumento de volume, lóbulos com bordas abauladas, deposição de fibrina aderida à superfície do órgão, espessamento de ductos e aumento de volume da vesícula biliar. Também foi observado um ponto negro no parênquima, onde foi encontrado um parasito adulto migrando para fora do órgão (FIGURA 1).

Após a dissecação, foram recuperados 67 parasitos adultos, sendo 61 nos ductos hepáticos e 6 presentes dentro da vesícula biliar. Ovos do parasito também foram obtidos da vesícula biliar.

Microscopicamente foi observada a presença de parasitos adultos no interior de ductos biliares, com intenso infiltrado inflamatório multifocal e perivascular, constituídos por células mononucleares. Foram observadas também áreas com fibrose e nos ductos biliares, além do espessamento da parede, foram observados ovos do parasito em seu interior (FIGURAS 2 e 3).

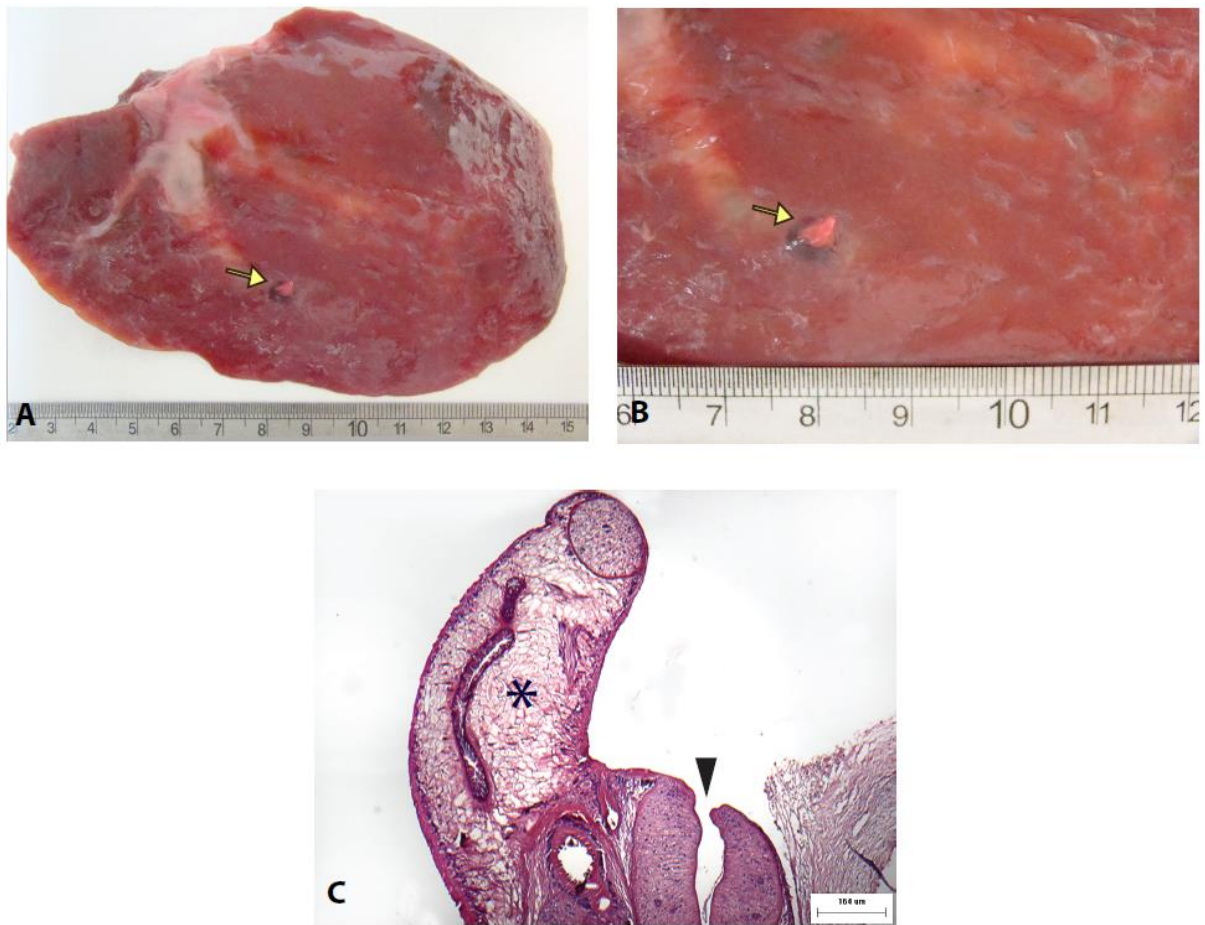


FIGURA 1 - Fígado de ovino experimentalmente infectado com 150 metacercárias de *Fasciola Hepatica*, aos 97 dias pós-infecção. (A e B) Face externa do fígado, contendo extremidade anterior do parasito adulto, rompendo a cápsula do fígado (seta amarela). (C) Secção longitudinal do exemplar adulto de *Fasciola hepatica* mostrado na imagem A e B. O parasito é revestido por tegumento, centralmente encontra-se o ceco envolto por parênquima mesenquimatoso (asterisco). Na extremidade anterior encontra-se a ventosa ventral (cabeça de seta) (Aumento: 4x; 164 μ m).

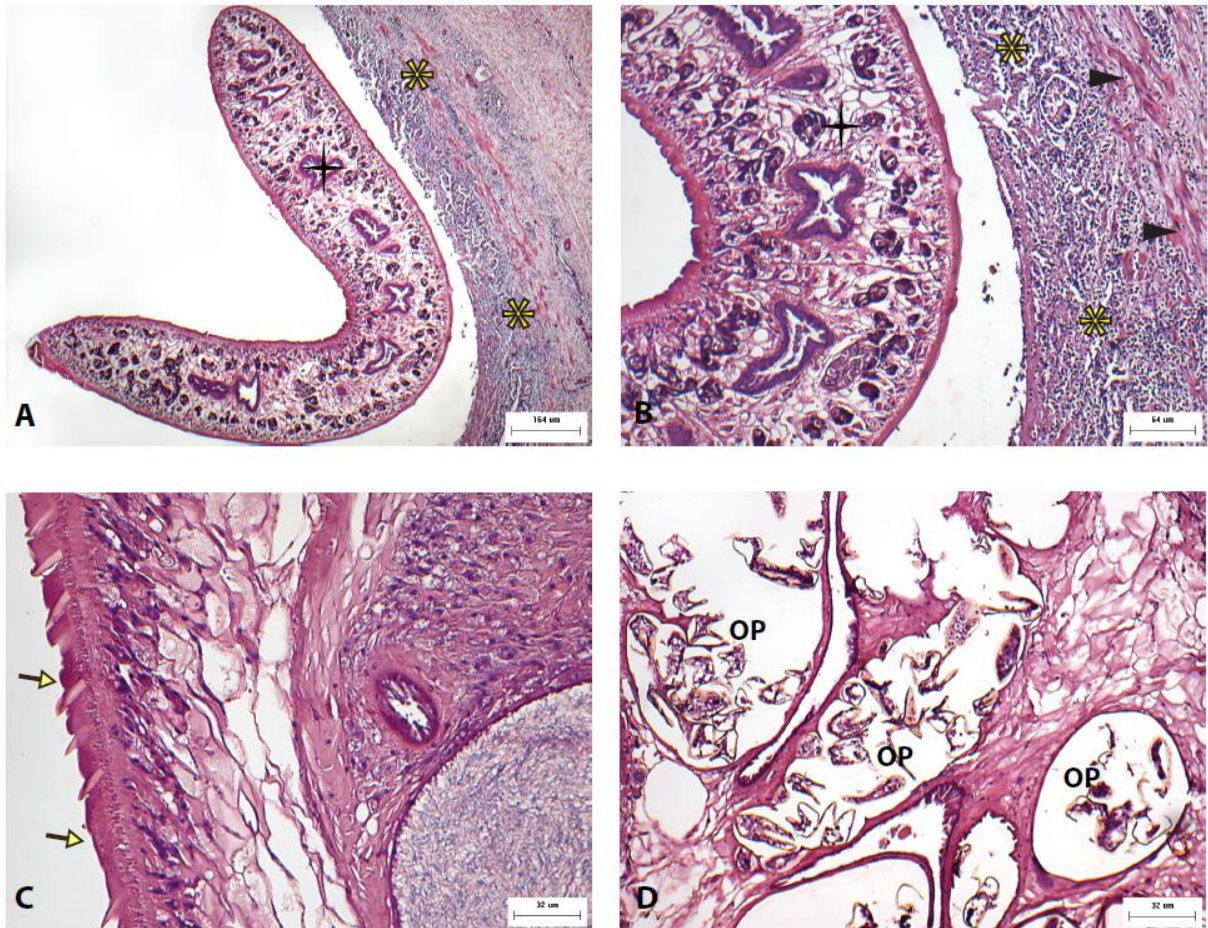


FIGURA 2 - Fígado de ovino experimentalmente infectado com 150 metacercárias de *Fasciola Hepatica*, aos 97 dias pós-infecção. (A) Corte transversal de um parasito (estrela) no lúmen de um ducto com hiperplasia do epitélio e fibrose periductal (asterisco amarelo) (Aumento: 4x; Barra: 164 μ m). (B) Maior aumento do parasito (estrela) mostrado na Figura A. Processo infamatório crônico difuso na parede do ducto e se estendendo para o parênquima hepático associado à processo inflamatório crônico difuso no parênquima hepático (asterisco amarelo) e fibroplasia (cabeça de seta) (Aumento: 10x; Barra: 64 μ m). (C) Detalhe do tegumento do parasito com espinhos (seta amarela) (Aumento: 20x; Barra: 32 μ m). (D) Fragmentos de ovos (OP) no interior do útero do parasito (Aumento: 20x; Barra: 32 μ m).

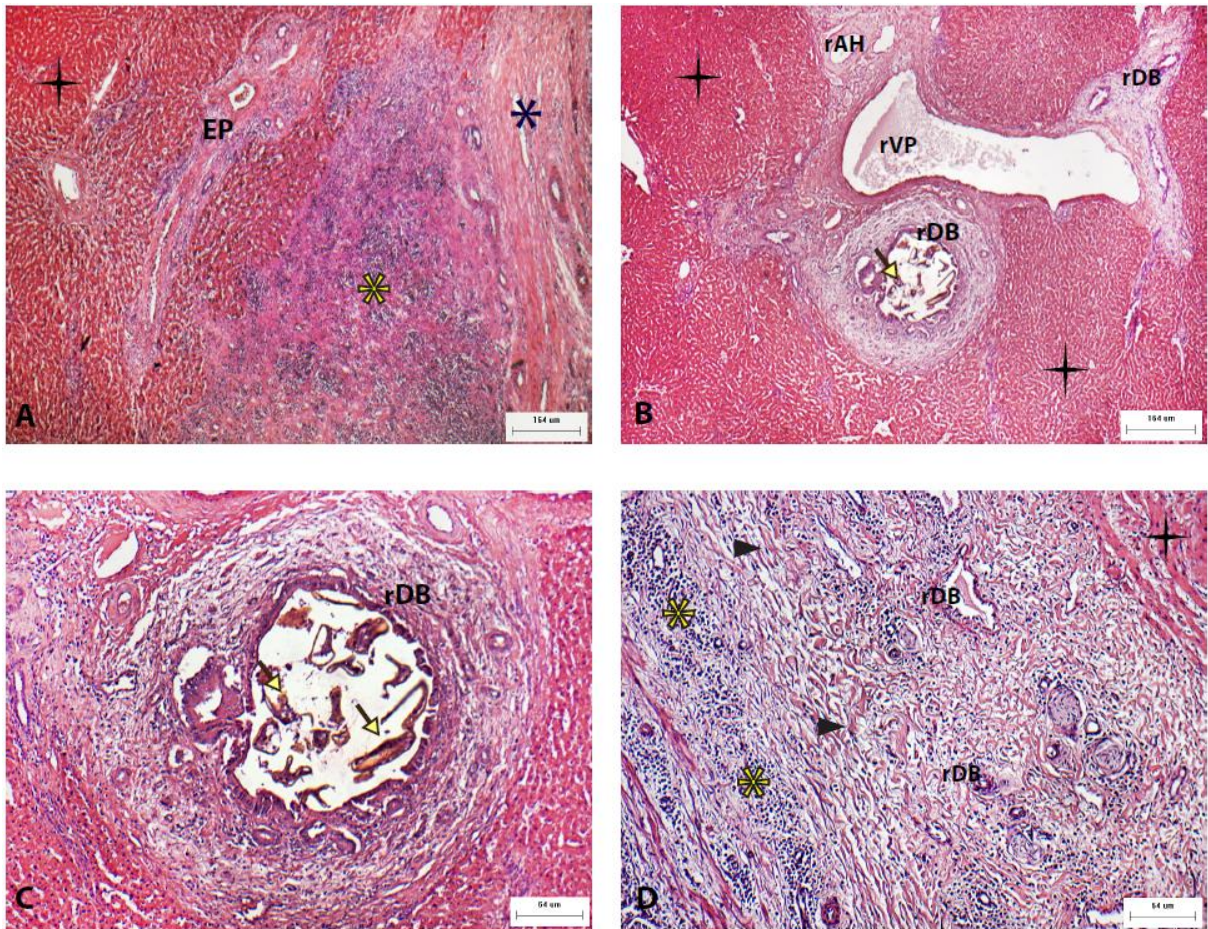


FIGURA 3 – Fotomicrografia do fígado de ovino experimentalmente infectado com 150 metacercárias de *Fasciola Hepatica*, aos 97 dias pós-infecção. (A) Área extensa de fibrose (asterisco) e proliferação de ductos biliares associada a intenso infiltrado inflamatório (asterisco amarelo) adjacente ao espaço porta (EP) e tecido hepático normal (estrela) (Aumento: 4x; Barra: 164 μ m). (B) Espaço porta com presença de ramos da artéria hepática (rAH), ramo da veia porta (rVP) e ramos do ducto biliar (rDB) podendo se observar, no interior de um dos ramos, a presença de fragmentos de ovos do parasito *Fasciola hepatica* (seta amarela). Adjacente há tecido hepático normal (estrela) (Aumento: 4x; Barra: 164 μ m). (C) Ducto biliar (rDB) seccionado transversalmente e contendo no lúmen fragmentos de ovos do parasito (seta amarela) (Aumento: 10x; Barra: 64 μ m). (D) Segmento do fígado (estrela) com presença de inflamação difusa (asterisco amarelo), fibroplasia (cabeça de seta) e ramos de ducto biliar (rDB) (Aumento: 10x; Barra: 64 μ m).

4. Discussão

Apesar da importância que a fasciolose apresenta na pecuária mundial, poucos trabalhos na literatura, abordam em um único estudo aspectos parasitológicos, hematológicos e imunológicos da interação do parasito com seu hospedeiro vertebrado.

As alterações decorrentes da infecção variam entre as espécies de vertebrados que são acometidos, resultando em processos patológicos e imunológicos que variam consideravelmente de hospedeiro para hospedeiro (Sinclair 1962; Thorpe, 1965; Boray 1969; Zhang et al., 2005).

Diferentes raças de uma espécie, também podem apresentar variações na susceptibilidade à infecção. Neste contexto, pode-se citar os ovinos, animais que desenvolvem pouca resistência à infecção por *F. hepatica*, muitas vezes morrendo ainda na fase águia da infecção. (Ross et al., 1966; Boray, 1969; Mulcahy & Dalton, 2001; Zhang et al., 2005; Raadsma et al., 2007; Flynn et al., 2007; Pleasance et al., 2010; Dalton et al., 2013).

A raça Santa Inês é uma raça de ovinos cada vez mais utilizados para a produção de carne e pele. Suas adaptações às condições climáticas da região semi-árida incluem elevada rusticidade, menor exigência nutricional e boa conversão alimentar e adaptabilidade aos ambientes de temperaturas elevadas. Portanto, esses animais são importantes para as pequenas e grandes criações, e foram escolhidos para esse estudo (Cunha et al. 2008).

Em relação aos aspectos parasitológicos da raça frente à infecção por *F. hepatica*, todos os 8 ovinos infectados mostraram-se susceptíveis à infecção sendo observados ovos do parasito em suas fezes aos 60 dias após infecção (dpi). O acompanhamento da eliminação de ovos por grama de fezes (OPG) foi realizado mensalmente até os 150 dpi, e nesse período foi observado um aumento constante no número de ovos eliminados. A média de ovos recuperados foi de 11,1 ($\pm 6,3$) aos 60 dpi, de 150,8 ($\pm 50,8$) aos 90 dpi, de 772,6 ($\pm 603,5$) aos 120 dpi e de 848,1 ($\pm 541,8$) aos 150 dpi. Esses achados estão de acordo com os descritos na literatura, inclusive para outras raças de ovinos, como Billilois, Texel e Cheviot (Cahuvin et al., 1995; Zhang et al., 2005; Haçariz et al., 2009; Martínez-Pérez et al., 2012).

Outro fator importante durante a infecção por *F. hepatica* em seus hospedeiros vertebrados, são as alterações hematológicas observadas, tanto em células vermelhas quanto em células brancas (Sinclair, 1962; Flynn et al., 2010).

Em nosso trabalho, havia alterações na média de hemácias, hemoglobina e hematócrito, que se mantiveram abaixo no grupo de animais infectados quando comparado aos animais controle, durante o período experimental. Ao se observar esses parâmetros em conjunto podemos determinar um leve quadro anêmico, que se torna mais evidente aos 90 dpi. Esta alteração tem sido descrita na literatura como uma característica importante da doença (Holmes et al., 1968; Saleh, 2008; Flynn et al., 2010).

A anemia descrita na fasciolose pode ser devido a uma perda anormal de células vermelhas, como resultado da migração do parasito pelo parênquima hepático, que lesiona células e vasos, e também dos hábitos de alimentação dos parasitos. Ou ainda por uma destruição anormal de células vermelhas causadas por algum fator de lise produzido por *F. hepatica* (Holmes et al., 1968).

Em relação as células brancas, observou-se nesse estudo um aumento da contagem total de leucócitos principalmente até os 60 dpi, sendo que os valores decaíram após esse intervalo chegando aos seus níveis iniciais aos 120 e 150 dpi. Um aumento também na média de linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos foram observados.

Esses dados corroboram em parte com os descritos na literatura, nos quais os autores relatam aumento na contagem total de leucócitos e eosinófilos, mas não detectaram aumento nos demais tipos celulares, mesmo em ovinos de diferentes raças (Chauvin et al., 1995; Zhang et al., 2005; Haçariz et al., 2009). A eosinofilia é o achado mais marcante e descrito da fasciolose, entretanto também é um achado que ocorre na maioria das infecções helmínticas (Flynn et al., 2010).

Em relação à resposta imunológica dos ovinos Santa Inês, foram dosados os níveis de TGF- β , uma citocina reguladora do sistema imune após sua ativação, em sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) estimulas *in vitro* por antígenos do parasito, dos ovinos infectados e controle (Zhang et al., 2005; Balbino et al., 2005; Chung et al., 2012).

Foram detectados níveis de TGF- β em todos os intervalos analisados, sugerindo que essa citocina é continuamente produzida no decorrer da infecção, uma vez que o parasito promove danos teciduais constantes durante sua migração e também após alcançar os ductos biliares, onde os espinhos presentes em seu tegumento causam lesões mecânicas severas nas paredes desses ductos (Andrews, 1999). Esses danos provocados pelo parasito são capazes de ativar o sistema imune do hospedeiro durante todo o curso da infecção.

Esses resultados corroboram com os descritos na literatura por Flynn et al. (2010), Moxon et al. (2010) e Chung et al. (2012), até mesmo em outros hospedeiros vertebrados.

TGF- β também é descrito na literatura como uma citocina relacionada com a fibrose observada no fígado dos ovinos. A fibrose é uma parte do processo de reparo de tecidos lesionados, que ocorre pela cicatrização com perda da atividade funcional. Nesse processo de reparação, após a lesão do tecido hepático e de vasos sanguíneos, ocorre uma sinalização química e celular que agregam primeiramente plaquetas para estancar hemorragias. Essas plaquetas produzem TGF- β e outros mediadores que formam um ambiente quimiotático que orienta a migração de células envolvidas na instalação da resposta inflamatória, com a liberação de citocinas típicas de uma resposta Th1 (Balbino et al., 2005; Haçariz et al., 2009). Na análise microscópica do fígado do ovino que veio a óbito antes do fim do experimento, foram observados pontos de fibrose no parênquima hepático.

Em nosso experimento, também foram dosados os níveis de óxido nítrico através da mensuração da concentração de nitrito (NO₂⁻) (HIBBS et al., 1988; ROBERT et al., 2001), no sobrenadante das mesmas culturas de PBMCs. Foi observado um aumento nos níveis de NO a partir de 30 dpi, e esses níveis se mantiveram elevados até os 150 dpi, em comparação ao grupo controle.

O óxido nítrico (NO) é sintetizado principalmente por macrófagos classicamente ativados, mas também por outros tipos celulares como neutrófilos e células epiteliais (Balbino et al., 2005). O aumento de sua produção ocorre em resposta a secreção de citocinas pró-inflamatórias durante a presença de antígenos de parasitos, promovendo a destruição desses organismos por meio de sua ação citotóxica (Gazzinelli et al., 1992; Cervi et al., 1998; Pfarr et al., 2001; Sibille et al., 2004; Zhang et al., 2005).

Citocinas produzidas na fase inicial de infecções helmínticas, geralmente IFN- γ e TNF- α (Th1), podem estimular a expressão de iNOS em hospedeiros infectados. (Zhang et al., 2005). Nas infecções por *F. hepatica* em ratos, já foi demonstrado que ocorre uma superprodução de NO pelas células peritoneais com atividade fasciolicida. E juntamente com os elevados níveis de NO foi observado a produção de INF- γ (Zhang et al., 2005).

Esses dados sugerem que pode haver ainda em fases mais avançadas da infecção, um misto de resposta Th1 e Th2, não somente Th2, como descrito por alguns autores (Zhang et al., 2005; Flynn et al., 2010; Mendes et al., 2013). Uma vez que observamos produção de NO durante todo o período experimental.

O parasito migra pela cavidade abdominal e pelo parênquima hepático, até chegar aos ductos biliares. Nesse trajeto, forma-se um novo foco inflamatório por cada região que o parasito vai migrando, com a presença de lesões mecânicas, liberação de

mediadores e outros compostos com ação quimio atraentes e o recrutamento de macrófagos, neutrófilos e fibroblastos para que ocorra uma reparação tecidual e cicatrização. Nesse processo inflamatório, característico da resposta imune inata, ocorre a síntese do NO, na tentativa de eliminação do parasito (Balbino et al., 2005).

Nossos dados também demonstram que uma resposta imune específica para antígenos do parasito é iniciada pela rápida produção de anticorpos IgG, já sendo detectado um aumento nos níveis séricos a partir de 30 dpi, fase aguda da infecção. Sendo que após 120 dpi, fase crônica, os níveis desse anticorpo começam a decair para níveis basais.

Esses resultados estão de acordo com os observados por Chauvin et al., (1995), Ferre et al., (1997) e Raadsma et al., (2007).

Esses dados sugerem que uma resposta humoral promovida pelo hospedeiro já pode ser observada logo no início da infecção, em resposta a migração do parasito pelo parênquima hepático. E que a redução significativa do nível de IgG observados na fase crônica da infecção, sugerem que após o estabelecimento do parasito nos ductos biliares, a estimulação antigênica reduz consideravelmente e isto pode contribuir com a sobrevivência do parasito e hospedeiro, demonstrando que os anticorpos por si só, tem provavelmente, um efeito protetor limitado na fasciolose ovina (Ferre et al., 1997).

Em relação ao processo patológico promovido pelo parasito durante a infecção, após a análise e dissecação do fígado do ovino que veio a óbito aos 97 dias após infecção, macroscopicamente foi observado aumento de volume, lóbulos com bordas abauladas, deposição de fibrina aderida à superfície do órgão, espessamento de ductos e aumento de volume da vesícula biliar. Esses resultados estão de acordo diversos relatos da literatura (Dow et al., 1968; Sinclair, 1975; Saleh, 2008). Microscopicamente, foi observada a presença de parasitos adultos dentro de ductos biliares, caracterizando a fase crônica da infecção, com intenso infiltrado inflamatório multifocal e perivascular, constituídos por células mononucleares. Foram observadas também áreas com colagenogênese e nos ductos biliares, além do espessamento da parede, foram observados ovos do parasito em seu interior. Esses resultados corroboram com os descritos na literatura (Dow et al., 1968; Bostelmann et al., 2000; Pérez et al., 2002).

Baseado nos resultados aqui reportados, uma resposta imune celular e humoral específica para o parasito em ovinos da raça Santa Inês é similar a demais raças já estudadas. Embora essa resposta promovida pelo hospedeiro não desempenhe um papel protetor contra o estabelecimento da infecção.

Embora significantes avanços no entendimento de aspectos imunobiológicos da relação de *F. hepatica* com seus hospedeiros tenham sido realizados nos últimos anos, precisa-se aumentar o conhecimento sobre os mecanismos relacionados à susceptibilidade ou resistência do hospedeiro a esse parasito para melhor controle da doença.

5. Referências bibliográficas

ANDREWS S. J. The life cycle of *Fasciola hepatica* In: Dalton, J. P. Fasciolosis. Dublin: CABI Publishing, p. 1-29, 1999.

BALBINO C. A.; PEREIRA L. M.; CURI R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. Braz. J. Pharm. Sci., 41(1): 27-51, 2005.

BORAY J. C. Experimental fascioliasis in Australia. Adv. Parasitol., 7: 95-210, 1969.

BOSTELMANN S. C. W., LUZ E., THOMAZ SOCCOL V.; CIRIO S. M. Histopatologia comparativa em fígados de bovinos, bubalinos e ovinos infectados por *Fasciola hepatica*. Arch. Vet. Sci., 5: 95-100, 2000.

CERVI L.; ROSSI G.; CEJAS H.; MASI H. D. T. *Fasciola hepatica* - induced immune suppression of spleen mononuclear cell proliferation: role of nitric oxide. Clin. Immunol. Immunop., 87(2): 145–154, 1998.

CHAUVIN A.; BOUVET G.; BOULARD A. Humoral and Cellular Immune Responses to *Fasciola hepatica* Experimental Primary and Secondary Infection in Sheep. Int. J. Parasitol., 25(10): 1227-1241, 1995.

CHUNG J. Y.; BAE Y. A.; YUN D. H.; YANG H. J.; KONG Y. Experimental murine fascioliasis derives early immune suppression with increased levels of TGF- β and IL-4. Korean J. Parasitol., 50(4): 301-308, 2012.

CUNHA E. A.; SANTOS L. E.; BUENO M. S. Atualidades na produção de ovinos para corte. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 152 p, 2008.

DALTON J. P.; ROBINSON M. W.; MULCAHY G.; O'NEILL S. M.; DONNELLY, S. Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: Candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. Vet. Parasitol., 195: 272-285, 2013.

DOW C.; ROSS J. G.; TODD J. R. The histopathology of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Vet. Parasitol.*, 58(1): 129-135, 1968.

FERRE I.; ORTEGA-NORA L. M.; ROJO-VÁZQUEZ F. A. Serum and bile antibody responses (IgG and IgA) during subclinical *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vet. Parasitol.*, 68: 261-267, 1997.

FERREIRA NETO J. M.; BIONDINI J. B.; CARVALHO M. M. Leucograma de caprinos confinados e em pastoreio semi-extensivo. *Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte*, 34(2): 221-227, 1982.

FERREIRA NETO J. M.; VIANA E. S. *Patologia clínica veterinária*. Belo Horizonte: Rabelo, 279 p, 1977.

FLYNN R. J.; IRMIN J. A.; OLIVIER M.; SEKIYA M.; DALTON J. P.; MULCAHY G. Alternative activation of ruminant macrophages by *Fasciola hepatica*. *Vet. Immunol. Immunop.*, 120: 31-40, 2007.

FLYNN R. J.; MULCAHY G.; ELSHEIKHA H. M. Coordinating innate and adaptive immunity in *Fasciola hepatica* infection: Implications for control. *Vet. Parasitol.*, 169: 235-240, 2010.

GAZZINELLI, R. T., OSWALD I. P., JAMES, S. L., AND SHER, A. IL- 10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- γ - activated macrophages, *J. Immunol.*, 148(6): 1792-1796, 1992.

HAÇARIZ O.; SAYERS G.; FLYNN R. J.; LEJEUNE A.; MULCAHY G. IL-10 and TGF-beta1 are associated with variations in fluke burdens following experimental fasciolosis in sheep *Parasite. Immunol.*, 31: p.613-622, 2009.

HIBBS J. R.; TAINTOR P. R.; VAVRIN Z.; RACHLIN E. M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 157: 87- 94, 1988.

HOLMES P. H.; DARGIE J. D.; MACLEAN J. M.; MULLIGAN W. The anaemia in fascioliasis: studies with cr-labelled red cells. *J. Comp. Path.*, 78: 415-420, 1968.

LIMA W. S.; BARÇANTE J. M. P.; BARÇANTE T.A.; GUIMARÃES M. P.; SOARES L. R. M. Occurrence of *Fasciola hepatica* (LINNAEUS, 1758) infection in Brazilian cattle in the State of Minas Gerais. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 18: 1-10, 2009.

LUNA L. G. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 258 p, 1968.

MARTINEZ-PEREZ J. M.; ROBLES-PEREZ D; ROJO-VAZQUEZ F. A.; MARTINEZ-VALLADARES M. Comparison of three different techniques to diagnose *Fasciola hepatica* infection in experimentally and naturally infected sheep. *Vet. Parasitol.*, 190:80–86, 2012.

MENDES E. A.; MENDES T. A.; DOS SANTOS S. L.; MENEZES-SOUZA D.; BARTHOLOMEU D. C.; MARTINS I. V.; SILVA L. M.; LIMA, W. S. Expression of IL-4, IL-10 and IFN-gamma in the liver tissue of cattle that are naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.*, 195(1-2): 177-182, 2013.

MOREAU E.; CHAUVIN A. Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections. *J. Biomed. Biotechnol.*, ID428593, 9 pages. doi:10.1155/2010/428593, 2010.

MOXON J. V.; FLYNN R J.; GOLDEN O.; HAMILTON J. V.; MULCAHY G.; BROPHY P. M. Immune responses directed at egg proteins during experimental infection with the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Parasite Immunol.*, 32(2); 111-124, 2010.

MULCAHY G.; DALTON J. P.; Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Res. Vet. Sci.* 70: 83-86, 2001.

PÉREZ J.; ORTEGA J.; MORENO T.; MORRONGO P.; LÓPEZ-SÁNCHEZ C.; MARTÍNEZ-MORENO A. Pathological and immunohistochemical study of the liver and

hepatic lymph nodes of sheep chronically reinfected with *Fasciola hepatica*, with or without triclabendazole treatment. *J. Comp. Path.*, 127: 30–36, 2002.

PFARR K. M.; QAZI S.; FUHRMAN J. A. Nitric oxide synthase in filariae: demonstration of nitric oxide production by embryos in *Brugia malayi* and *Acanthocheilonema viteae*. *Exp. Parasitol.*, 97(4): 205–214, 2001.

PIEDRAFITA D.; RAADSMA H. W.; PROWSE R.; SPITHILL T. W. Immunology of the host-parasite relationship in fasciolosis (*Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*). *Can. J. Zool.*, 82: 233-250, 2004.

PLEASANCE J.; RAADSMA H. W.; ESTUNINGSIH S. E.; WIDJAJANTI S.; MEEUSEN E.; PIEDRAFITA D. Innate and adaptive resistance of Indonesian Thin Tail sheep to liver fluke: a comparative analysis of *Fasciola gigantica* and *F. hepatica* infection. *Vet. Parasitol.*, 178: 264–272, 2010.

PLEASANCE J.; WIEDOSARI E.; RAADSMA H. W.; MEEUSEN E.; PIEDRAFITA D. Resistance to liver fluke infection in the natural sheep host is correlated with a type-1 cytokine response. *Parasite Immunol.*, 33: 495–505, 2011.

RAADSMA H. W.; KINGSFORD N. M.; SUHARYANTA; SPITHILL T. W.; PIEDRAFITA D. Host responses during experimental infection with *Fasciola gigantica* or *Fasciola hepatica* in Merino sheep I. Comparative immunological and plasma biochemical changes during early infection. *Vet. Parasitol.*, 143(3-4): 275-286, 2007.

ROBERTS J.A.; ESTUNINGSIH E.; WIDJAYANTI S.; WIEDOSARI E.; PARTOUTOMO S.; SPITHILL T. W. Resistance of Indonesian thin tail sheep against *Fasciola gigantica* and *F. hepatica*. *Vet. Parasitol.*, 68: 69–78, 1997.

ROJO-VÁZQUEZ F. A.; MEANA A.; VALCÁRCEL F.; MARTÍNEZVALLADARES M. Update on trematode infections in sheep. *Vet. Parasitol.*, 189(1): 15-38, 2012.

ROPERT C.; ALMEIDA I. C.; CLOSEL M.; TRAVASSOS L. R.; FERGUSON M. A.; COHEN P.; GAZZINELLI R. T. Requirement of mitogen-activated protein kinases and

I kappa B phosphorylation for induction of proinflammatory cytokines synthesis by macrophages indicates functional similarity of receptors triggered by glycosylphosphatidylinositol anchors from parasitic protozoa and bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.*, v. 166, n. 5, p. 3423-31, 2001.

ROSS J. G.; TODD J. R.; DOW C. Single experimental infections of calves with the liver fluke, *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). *J. Comp. Pathol.*, 76(1): 67-81, 1966.

SALEH M. A. Circulating oxidative stress status in desert sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.*, 154(3-4): 262-269, 2008.

SIBILLE P.; TLIBA O.; BOULARD C. Early and transient cytotoxic response of peritoneal cells from *Fasciola hepatica*-infected rats, *Vet. Res.*, 35(5): 573-584, 2004.

SINCLAIR K. B. Observations on the clinical pathology of ovine fascioliasis. *Br. Vet. J.*, 37: 37-53, 1962.

SINCLAIR K. B. Pathogenesis of *Fasciola hepatica* and other liver-flukes. *Helminthol.*, 36(2): 115-134, 1967.

SINCLAIR K. B. The resistance of sheep to *Fasciola hepatica*: studies on the pathophysiology of challenge infections. *Res. Vet. Sci.*, 19:296-303, 1975.

THORPE E. Liver damage and the host-parasite relationship in experimental fascioliasis in the albino rat. *Res. Vet. Sci.*, 6(4): 498-509, 1965.

TRIVILIN L. O. Avaliação histopatológica e imunoistoquímica de fígados de bovinos cronicamente infectados por *Fasciola hepatica*. Dissertação (MESTRADO EM Ciências veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 116p, 2010.

ZHANG W. Y.; MOREAU E.; UOPE J. C.; HOWARD C.J.; HUANG W. Y.; CHAUVIN A. *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: Comparison of cellular response to experimental infection in sheep. *Exp. Parasitol.*, 111: 154-159, 2005.

5. CONCLUSÕES

- Bovinos e bubalinos naturalmente infectados por *Fasciola hepatica* são observados nos municípios de Pedro Leopoldo e São José da Lapa, fato que comprova a expansão do parasito no estado de Minas Gerias e evidência a necessidade de maiores estudos para se conhecer a real situação da dispersão do parasito.
- *Lymnaea columella* podem ser encontrados naturalmente infectados por *F. hepatica* nos municípios estudados, demonstrando a ocorrência do ciclo do parasito. Podendo ser uma fonte de contaminação para outras espécies de animais, inclusive o homem.
- Ovos de *F. hepatica* recuperados dos bovinos e bubalinos naturalmente infectados, são viáveis sendo possível o fechamento do ciclo em condições laboratoriais com a passagem em *L. columella* e infecção em ovinos.
- A origem da água oferecida aos animais das propriedades, bem como a distância da fonte de água das pastagens são fatores associados à ocorrência da fasciolose.
- Ovinos da raça Santa Inês são susceptíveis à infecção por *F. hepatica*, ocorrendo alterações em parâmetros parasitológicos, hematológicos e imunológicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABROUS M.; RONDELAUD D.; DREYFRSS G. A field study of natural infections in three freshwater snails with *Fasciola hepatica* and/or *Paramphistomum daubneyi* in central France. J. Helminthol., 74: 189-194, 2000.

ALHO C. J. R.; CAMPOS Z. M. S.; GONÇALVES H. C. Ecologia de capivara (*Hydrochaeris hydrocharis*, *Rodentia*) do Pantanal: atividade, sazonalidade, uso do espaço e manejo. R. bras. Biol., 47(1): 99-110, 1987.

ALVES D. P.; CARNEIRO M. B.; MARTINS I. V. F.; BERNARDO C. C.; DONATELE D.M.; PEREIRA JÚNIOR O. S.; ALMEIDA B. R.; AVELAR B. R.; LEÃO A. G. C.; ALVES, D. P. Distribution and factors associated with *Fasciola hepatica* infection in cattle in the south of Espírito Santo State, Brazil. J. Ven. An. And Tox. Trop. Dis., 17: 271-276, 2011.

AMATO, S. B.; REZENDE, H. E. B.; GOMES, D. C.; SERRA-FREIRE, N. M. Epidemiology of *Fasciola Hepatica* infection in the Paraíba River Valley, São Paulo, Brasil. Vet. Parasitol., 22(3-4): 275 - 284, 1986.

ANTHONY R. M.; RUTITZKY L. I.; URBAN JR. J. F.; STADECKER M. J.; GAUSE W. C. Protective immune mechanisms in helminth infection. Nat. Rev.Immunol., 7: 975-87, 2007.

ARAÚJO J. L. B.; LINHARES G. F. C.; OLIVEIRA A. P. M.; AMORIL J. G.; FREITAS M. R.; COSTA I. C.; PINHEIRO V. J. L.; ESSELIN I. R. R.; REIS S. A. Infecções autóctones de bovinos por *Fasciola hepatica* LINNAEUS, 1758 (TREMATODA, FASCIOLIDAE) no Estado de Goiás, Brasil. Rev. de Patol. Trop., 36: 96-100, 2007.

ARAÚJO J. L. B.; LINHARES G. F. C.; PAÇO J. M. Ocorrência de *Lymnaea columella* (Say, 1817) (mollusca, pulmonata, lymnaeidae), no estado de Goiás. Considerações sobre os parasitos por ela transmitidos. Rev. Pat. Trop., 24(2): 291-300, 1995.

BARGUES M. D.; VIGO M.; HORAK P.; DVORAK J.; PATZNER R. A.; POINTIER J. P.; JACKIEWICZ M.; MEIER-BROOK C.; MAS-COMA S. European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infect. Gen. Evol.*, 1: 85-107, 2001.

BECK, A. A. H. Fasciolose. *Hora Vet.*, 75: 65-70, 1993.

BELLATO V.; SOUZA A. P.; SARTOR A. A.; VEIGA L. P. H. N.; CENTENARO F. *Fasciola hepatica* occurrence in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) and bovines (*Bos taurus*) in Timbó, SC, Brazil. *Ver. Ciênc. Agrovet.*, 8(1): 66-70, 2009.

BENNEMA S. C.; SCHOLTE R. G. C.; MOLENTO M. B.; MEDEIROS C.; CARVALHO O. S. *Fasciola hepatica* in bovines in Brazil: data availability and spatial distribution. *Med. Trop. São Paulo*, 56(1): 35-41, 2014.

BERNARDO C. C. Prevalência da fasciolose em bovinos abatidos em matadouro frigorífico no sul do estado do Espírito Santo. Monografia (Graduação) Universidade Federal do Espírito Santo, 2009.

BERNARDO C. C.; AVELAR B. R.; IGNACCHITI M. D. C.; MARTINS I. V. F.; PEREIRA M. J. S. Comparação de kits ELISA® comerciais para anticorpos no soro e leite com um teste coproparasitológico em bovinos naturalmente infectados por *Fasciola hepatica*. *Pesq. Vet. Bras.*, 33(1): 37-40, 2013.

BERNARDO C. C.; CARNEIRO M. B.; AVELAR B. R.; DONATELE D. M.; MARTINS I. V. F.; PEREIRA M. J. S. Prevalence of liver condemnation due to bovine fasciolosis in Southern Espírito Santo: temporal distribution and economic losses. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal, 20(1): 49-53, 2011.

BERNE M. E. A. Identificação e purificação de antígenos somáticos de formas adultas de *Fasciola hepatica* através de anticorpos monoclonais: ensaios de imunoproteção e imunodiagnóstico. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, 168p, 1994.

- BORAY J. C. Experimental fascioliasis in Australia. *Adv. Parasitol.*, 7: 95-210, 1969.
- CALDAS W. S.; LIMA W. S.; CURY M. C.; MALACCO M. A. F.; SILVA R. S. Prevalência de *Fasciola hepatica* em bovinos de algumas mesorregiões do Estado de Minas Gerais. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA. Anais. Campo Grande-MTS, p.140, 1995.
- CARNEIRO M. B.; BERNARDO C. C.; JUNIOR A. C.; ALVES D. P.; JUNIOR O. S. P. MARTINS I. V. F. *Fasciola hepatica* in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in the southern Espírito Santo. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 32(2): 89-91, 2010.
- CARVALHO, J. C. M. Contribuição para o conhecimento da fauna helmintológica de Minas Gerais. *Ceres*, 1(5): 411-423, 1940.
- CLERY D. G. & MULCAHY G. Lymphocyte and cytokine responses of young cattle during primary infection with *Fasciola hepatica*. *Res. Vet. Sci.*, 65: 169-171, 1998.
- CLERY D.; TORGERSON P.; MULCAHY, G. Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.*, 62: 71-82, 1996.
- COELHO L. H. L. & LIMA W. S. Population dynamics of *Lymnaea columella* and its natural infection by *Fasciola hepatica* in the State of Minas Gerais, Brazil, *J. Helminthol.*, 77(1): 7-10, 2003.
- COELHO L. H.; GUIMARÃES M. P.; LIMA W. S. Influence of shell size of *Lymnaea columella* on infectivity and development of *Fasciola hepatica*. *J. Helminthol.*, 82(1): 77-80, 2008.
- COELHO, L. H. L.; LIMA, W. S.; GUIMARAES, M. P. Sympatric and allopatric combinations of *Lymnaea columella* and *Fasciola hepatica* from southern and south-eastern Brazil. *J. Helminthol.*, 83(03): 285-288, 2009.
- CORREA A. C.; ESCOBAR J. S.; DURAND P.; RENAUD F.; DAVID P.; JARNE P.; POINTIER J. P.; HURTREZBOUSSÈS S. Bridging gaps in the molecular phylogeny of

the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. BMC Evol. Biol., 9: 10:381, 2010.

COSTA, H.M.A.; GUIMARÃES, M.P.; LEITE, A.C.R.; LIMA, W.S. Distribuição de helmintos parasitos de animais domésticos no Brasil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 38(4): 465-679, 1986.

CRUZ-MENDOZA I.; FIGUEROA J. A.; CORREA D.; RAMOS-MARTÍNEZ E.; LECUMBERRI-LÓEZ J.; QUIROZ-ROMERO H. Dynamics of *Fasciola hepatica* infection in two species of snails in a rural locality of Mexico. Vet. Parasitol., 121: 87–93, 2004.

CUNHA F. P. V.; MARQUES S. M. T. MATTOS M. J. T. Prevalence of slaughter and liver condemnation due to *Fasciola hepatica* among sheep in the state of Rio Grande do Sul, Brazil 2000 and 2005. Parasitol. Latinoam., 62: 188-191, 2007.

DACAL A. R. M.; COSTA H. M. A.; LEITE A. C. R. Susceptibilidade de *Lymnaea* (*Pseudosuccinea*) *columella* (Say, 1817) exposta à infecção por miracídios de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo, 30(5): 361-369, 1988.

DAWES B. The migration of juvenile forms of *Fasciola hepatica* through the wall of the intestines in mouse, with some observations on food and feeding. Parasitol., 53: 109-122, 1963.

DENNIS W. R.; STONE W. M.; SWANSON L. E. A new laboratory and field diagnostic test for fluke ova in feces. J. Am. Vet. Med. Assoc., 124: 47-50, 1954.

DRACZ R. M.; LIMA W. S. Autochthonous infection of buffaloes and cattle by *Fasciola hepatica* in Minas Gerais, Brazil. Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal, 23(3): 413-416, 2014.

DREYFUSS G.; VIGNOLES P.; ABROUS M.; RONDELAUD D. Unusual snail species involved in the transmission of *Fasciola hepatica* in watercress beds in central France. Parasite., 9: 113-20, 2002.

DUTRA L. H.; MOLENTO M. B.; NAUMANN C. R. C.; BIONDO A. W.; FORTES F. S.; SAVIO D.; MALONE J. B. Mapping risk of bovine fasciolosis in the south of Brazil using Geographic Information Systems. *Vet. Parasitol.*, 169: 76-81, 2010.

EL-KOUBA M. M. A. N.; MARQUES S. M. T.; PILATI C.; HAMANN W. Presence of *Fasciola hepatica* in feral nutria (*Myocastor coypus*) living in a public park in Brazil. *J. Zoo. Wildl. Med.*, 40(1): 103-106, 2009.

EL-KOUBA M. M. A. N.; TIETZ S. M.; PILATI C.; HAMANN W. General aspects of Fascioliasis and Endoparasitic diseases in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris* Linnaeus, 1766) from three parks in the State of Paraná, Brazil. *Vet. Foco.*, 6(1): 4-15, 2008.

FARIA R. N.; CURY M. C.; LIMA W. S. Concordância entre duas técnicas coproparasitológicas para diagnóstico de *Fasciola hepatica* em bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 60(4): 1023-1025, 2008.

FARIA R. N.; CURY M. C.; LIMA W. S. Prevalence and dynamics of natural infection with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) in brazilian cattles. *Revue Méd. Vét.*, 156: 85-86, 2005.

FERRAZ K. M. P. M. B.; PETERSON A. T.; SCACHETTI-PEREIRA R.; VETTORAZZA C. A.; VERDADE L. M. Distribution of capybara in an agroecosystem Brazil, based on ecological niche modeling. *J. Mammal.*, 90(1): 189-194, 2009.

FLYNN R. J. & MULCAHY G. The roles of IL-10 and TGF- β in controlling IL-4 and IFN γ production during experimental *Fasciola hepatica* infection. *Int. J. Parasitol.*, 38: 1673-1680, 2008.

FRANÇA, I. Fasciolose hepática em bovinos no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo-Brasil. *Arch. Esc. Vet. Minas Gerais*, 19: 157-159, 1967.

GASSENBECK, C. P. H.; OVER, H. J.; NOORMAN, N. E.; DeLÉUW, W. A. Na epidemiological study of *Fasciola hepatica* in Netherlands. Vet. Quart., 14: 140-144, 1992.

GAYO V.; CUERVO P.; ROSADILLA D.; BIRRIEL S.; DELL'OCA L.; TRELLES A.; COURE U.; MERA Y SIERRA R. Natural *Fasciola hepatica* infection in nutria (*Myocastor coypus*) in Uruguay. J. Zoo. Wildl. Med., 42(2): 354–356, 2011.

GIRÃO, E. S.; UENO, H. Técnica de 4 tamises para o diagnóstico coprológico quantitativo da fasciolose dos ruminantes. Pesqui. Agropec. Bras., 20(14): 905-912, 1985.

GOMES F. F.; SANTOS J. A.; OLIVEIRA F. C. R.; LOPES C.W.G. Estabelecimento de foco de fasciolose hepática em propriedade do município de Campos Dos Goytacazes no Estado Do Rio De Janeiro, Brasil. Rev. Bras. Parasitol. Vet., 11(2): 53-56, 2002.

GONZÁLES J. C.; SANCHEZ V. M.; THOME J. W.; GONÇALVES P. C.; OLIVEIRA C. M. B. *Lymnaea columella*, hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758, no Rio Grande do Sul, Brasil. Arq. Fac.Vet. UFRGS, 2: 37-40. 1974.

GUTIÉRREZ A.; VÁZQUEZ A. A.; HEVIA Y.; SÁNCHEZ J.; CORREA A. C.; HURTREZ-BOUSSÈS S.; POINTIER J. P.; THÉRON A. First report of larval stages of *Fasciola hepatica* in a wild population of *Pseudosuccinea columella* from Cuba and the Caribbean. J. Helminthol., 85(1): 109-111, 2011.

KEEGAN P. S.; TRUDGETT A. *Fasciola hepatica* in the rat: immune responses associated with the development of resistance to infection. Parasite Immunol., 4(6): 657-69, 1992.

KLEIMAN F.; GONZÁLEZ N.; RUBEL D.; WISNIVEKSY C. *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda, Digenea) en liebres europeas (*Lepus europaeus*, Pallas 1778) (Lagomorpha, Leporidae) en la región Cordillerana Patagónica, Chubut, Argentina. Parasitol. Latinoam. 59: 68 - 71, 2004a.

KLEIMAN F.; PIETROKOVSKY S.; PARAENSE W. S.; WISNIVESKY-COLLI C. Southernmost finding of *Lymnaea viatrix* orbigny, 1835 (Pulmonata: Lymnaeidae), intermediate host of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea), in urban and rural areas of Patagonia, Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 99(1): 23-24, 2004b.

KLEIMAN F.; PIETROKOVSKY S.; GIL,S.; WISNIVESKY-COLLI, C. Comparison of two coprological methods for the veterinary diagnosis of fasciolosis. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 57(2): 181-185, 2005.

LIMA W. S.; BARÇANTE J. M. P.; BARÇANTE T.A.; GUIMARÃES M. P.; SOARES L. R. M. Occurrence of *Fasciola hepatica* (LINNAEUS, 1758) infection in Brazilian cattle in the State of Minas Gerais. Rev. Bras. Parasitol. Vet., 18: 1-10, 2009.

LUTZ A. Sobre a ocorrência da *Fasciola hepatica* no Estado do Rio de Janeiro. Bol. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1(1): 9-13, 1921.

MANGA-GONZALES Y.; GONZALEZ-LANZA C.; OTERO-MERINO C. B. Natural infection of *Lymnaea truncatula* by the liver fluke *Fasciola hepatica* in the Porma Basin, León, NW Spain. J. Helminthol., 65(1):15-27, 1991.

MARQUES S. M. T.; SCROFERNEKER M. L. *Fasciola hepatica* infection in cattle and buffaloes in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Parasitol. latinoam., 58(3-4): 169-172, 2003.

MARTÍNEZ-DÍAZ R. A.; MARTELLA M. B.; NAVARRO J. L.; PONCE-GORDO F. Gastrointestinal parasites in greater rheas (*Rhea americana*) and lesser rheas (*Rhea pennata*) from Argentina. Vet. Parasitol., 194: 75-78, 2013.

MARTÍNEZ-MORENO A.; MARTÍNEZ-MORENO F.J.; ACOSTA I.; GUTIÉRREZ P. N.; BECERRA C.; HERNÁNDEZ S. Humoral and cellular immune responses to experimental *Fasciola hepatica* infections in goats. Parasitol. Res., 83(7): .680-686, 1997.

MAS-COMA S. & BARGUES M.D. Human liver flukes: a review. Res. Rev. Parasitol., 57: 145-218, 1997.

MATTOS M. J. T.; UENO H.; GONÇALVES P. C.; ALMEIDA J. E. M. Seasonal occurrence and bioecology of *Lymnaea columella* Say, 1817 (mollusca, Lymnaeidae) in its natural habitat in Rio Grande do Sul. Rev. Bra. Méd. Vet., 19(6): 248-252, 1997.

MEDEIROS C.; SCHOLTEC R. G. C.; D'AVILA S.; CALDEIRA R. L.; CARVALHO O. S. Spatial distribution of lymnaeidae (mollusca, basommatophora), intermediate host of *Fasciola hepatica* linnaeus, 1758 (trematoda, digenea) in Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 56(3): 235-252, 2014.

MENDES E. A. Comportamento e desenvolvimento de *Fasciola hepatica* (1758) de bovinos naturalmente infectados em sagüi (*Callithrix penicillata*) e gerbil (*Meriones unguiculatus*). Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 134p, 2006.

MÜLLER G.; LARA S. I. M.; SILVEIRA Jr. P.; ANTUNES P. L. Acompanhamento laboratorial do ciclo biológico de *Lymnaea viatrix*, hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica*. Rev. Bras. Agrocienc., 4(3): 172-176, 1998.

NGUYEN T. S.; NGUYEN D. T.; NGUYEN T. V.; HUYNH V. V.; LE D. Q.; FUKUDA Y.; NAKAI, Y. Prevalence of *Fasciola* in cattle and of its intermediate host *Lymnaea snails* in central Vietnam. Trop. Anim. Health Prod., 44: 1847-1853, 2012.

OAKLEY, G.A.; OWEN, B.; KNAPP, N.H. Production effects of subclinical liver flukes infection in growing dairy heifers. Vet. Rec., 104: 503-507, 1979.

OLDHAM G. & WILLIAMS L. Cell mediated immunity to liver fluke antigens during experimental *Fasciola hepatica* infection of cattle. Parasite Immunol., 7: 503-516, 1985.

OLIVEIRA A. Distribuição geográfica de algumas zoonoses existentes no Rio Grande do Sul. Ver. Zootec., 19(3-4): 147-148, 1932.

OLIVEIRA E. L. Prevalência e fatores associados à distribuição da *Fasciola hepatica*, Linnaeus, 1758 em bovinos dos Municípios de Careagu e Itajubá, Região da Bacia do Rio

Sapucaí-Minas Gerais. 2008.100f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 100p, 2008.

OLIVEIRA S. M.; FUJII T. U.; FUJII T.; OLIVEIRA W. Fasciolose hepática em búfalos no Município de Pariquera-Açu, Vale do Ribeira, São Paulo. Ver. Bars. Ciênc. Farm., 15: 37, 1994.

OLIVEIRA S. M.; FUJII T. U.; SPÓSITO FILHA E.; MARTINS A. M. C. R. P. F. Ocorrência de *Lymnaea columella* say, 1817 infectada naturalmente por *Fasciola hepatica* (linnaeus, 1758), no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. Arq. Inst. Biol., 69(1): 29-37, 2002.

PARAENSE W. L. *Lymnaea columella* in Northern Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 78: 477-82, 1983.

PARAENSE W. L. *Lymnaea viatrix* and *Lymnaea columella* in the Neotropical Region: a distributional outline. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 77: 181-188, 1982.

PÊCEGO O. Fiscalização sanitária de carnes e derivados. Estatística de verificação e apreensões e sua importância. Rev. Soc. Bras. Med. Vet., 2: 375-389, 1925.

PILE E.; GAZETA G., SANTOS J. A. A.; COELHO B.; SERRA-FREIRE N. M. Ocorrência de fascioliasis humana no município de Volta Redonda, RJ, Brasil. Rev. Saúde Públ., 34(4): 413-414, 2000.

PILE E.; SANTOS J. A. A.; PASTORELLO T.; VASCONCELLOS M. *Fasciola hepatica* em búfalos (*Bubalus bubalis*) no município de Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., 38(1): 42-43, 2001.

PLEASANCE J.; WIEDOSARI E.; RAADSMA H. W.; MEEUSEN E.; PIEDRAFITA D. Resistance to liver fluke infection in the natural sheep host is correlated with a type-1 cytokine response. Parasite Immunol., 33: 495-505, 2011.

PREPELITCH L.; KLEIMAN F.; PIETROKOVSKY S. M.; MORIENA R. A.; RACIOPPI O.; ALVAREZ J.; WISNIVESKY-COLLI C. First report of *Lymnaea columella* Say, 1817 (Pulmonata: Lymnaeidae) naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 98(7): 889-891, 2003.

QUEIROZ V. S.; LUZ E.; LEITE L. C.; CÍRIO S. M. *Fasciola hepatica* (Trematoda, Fasciolidae): estudo epidemiológico nos municípios de Bocaiúva do Sul e Tunas do Paraná (Brasil). Acta Biol. Parana., 31(1-4): 99-111, 2002.

REY L. *Fasciola hepatica* no Gado do Rio Grande do Sul. Investigações sobre a possibilidade de ocorrência de casos humanos. Ver. Bras. Malar., 9(4): 473 - 483, 1957.

REZENDE H. E. B. DE; ARAÚJO J. L. DE B.; GOMES P. A. C.; NURENBERG S.; NETO M. P.; OLIVEIRA G. P. DE; MELLO R. P. DE Notas sobre duas espécies de *Lymnaea* Lamark, 1799, hospedeiros intermediários de *Fasciola hepatica* L. no Estado do Rio de Janeiro (Mollusca, Gastropoda, Basommatophora, Lymnaeidae). Arq. Univ. Fed. Rur., 3(1): 21-23, 1973.

RIBEIRO P. A. Incidência das causas de rejeição de bovinos no Brasil Central, prejuízos causados pelas mesmas nos anos de 1946/47. Ver. Fac. Med. Vet. S. Paulo, 4(1): 167 - 183, 1949.

ROBINSON M. W.; DALTON J. P. Zoonotic helminth infections with particular emphasis on fasciolosis and other trematodiasis. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 364(1530): 2763-2776, 2009.

ROJO-VÁZQUEZ F. A.; MEANA A.; VALCÁRCEL F.; MARTÍNEZVALLADARES M. Update on trematode infections in sheep. Vet. Parasitol., 189(1): 15-38, 2012.

ROSS J. G.; TODD J. R.; DOW C. Single experimental infections of calves with the liver fluke, *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). J. Comp. Pathol., 76(1): 67-81, 1966.

SANTARÉM V. A.; TOSTES R. A.; ALBERTI H.; SANCHES O. C. *Fasciola hepatica* in caybara. *Acta trop.*, 98: 311-313, 2006.

SCHWEIZER G.; MELI M. L.; TORGERSON P. R.; LUTZ H.; DEPLAZES P.; BRAUN U. Prevalence of *Fasciola hepatica* in the intermediate host *Lymnaea truncatula* detected by real time TaqMan PCR in populations from 70 Swiss farms with cattle husbandry. *Vet. Parasitol.*, 150: 164-169, 2007.

SERRA-FREIRE N. M. Fasciolose hepática no Brasil: Análise Retrospectiva e Prospectiva. *Cad Téc-Cient Esc Med Vet.*, 1(1): 9-70, 1999.

SERRA-FREIRE N. M. Fasciolose hepática. *Hora Vet.*, 1:13-18, 1995.

SERRA-FREIRE N. M.; NUERNBERG S. Dispersão Geopolítica da Ocorrência de *Fasciola hepatica* no Estado de Santa Catarina, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 87: 263-269, 1992.

SILVA I. C.; MULLER G.; MATTOS M. J. T.; CASTRO A. L. D.; ALMEIDA J. E. M.; UENO H. Fasciolose. I - incidência e importância na bovino e ovinocultura do RS. *Lav. Arroz.*, 33(323): 34-42, 1980.

SILVA O. M. C. Parasitoses animais. *Correio da Manhã*, Rio de Janeiro, p. 13, Julho, 1936.

SILVA R. E.; LIMA W. S.; CALDAS W. S.; CURY M. C.; MALACCO A. F. Primeiro encontro de *Lymnaea columella* (Say, 1817) naturalmente infectada por estádios intermediários de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) na cidade de Itajubá, MG. In XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia, Goiás, p. 205, 1995.

SILVA SANTOS I. C.; SCAINI C. J.; RODRIGUES L. A. F. *Myocastor coypus* (Rodentia capromyidae) como reservatório silvestre de *Fasciola hepatica* (Lineu, 1758). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 1(1): 27-30, 1992.

SOARES M. P.; SILVA S. S.; NIZOLI L. Q.; FELIX S. R.; SCHILD A. L. Chronic fascioliasis in farmed and wild greater rheas (*Rhea americana*). Vet. Parasitol., 145(1-2): 168-71, 2007.

THIENGO S. C.; FERNANDES M. A. Moluscos. In: BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas. [S.l.]: Editora do Ministério da Saúde, p. 13-20, 2007.

THORPE E. Liver damage and the host-parasite relationship in experimental fascioliasis in the albino rat. Res. Vet. Sci., 6(4): 498-509, 1965.

TOSTES R. A.; SANTARÉM V. A.; ALBERTI H.; SANCHES O. C. Autochthonous cases of *Fasciola hepatica* in Presidente Prudente region, São Paulo State, Brazil. Ciênc. Rural, 34(3): 961-962, 2004.

UENO H.; ARANDIA R.; MORALES G.; MEDINA G. Fascioliasis of livestock and snail host for *Fasciola* in the altiplano region of Bolivia. Nat. Inst. An. Heal. Quart., 15: 61-67, 1975.

UENO H.; GUTIERRES V. C.; MATTOS M. J. T.; MULLER G. Fascioliasis problems in ruminants in Rio Grande do Sul, Brazil. Vet. Parasitol., 11(2-3): 185-191, 1982.

UETA M. T. Infecção experimental de *Lymnaea columella* por *Fasciola hepatica*. Rev. Saúde Públ., de São Paulo, 11(1): 43-57, 1980a.

UETA M. T. Ocorrência de infecção natural de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 em *Lymnaea columella* Say, 1817 no Vale do Paraíba, SP, Brasil. Rev. Saúde Públ., de São Paulo, 14: 230-233, 1980b.

URQUHART G. M.; ARMOUR J.; DUNCAN J. L.; DUNN A. M.; JENNINGS F. W. Parasitologia Veterinária. 2ª Ed, Ed Guanabara Koogan. 286p, 1996.

VALERO M. A.; PERIAGO M. V.; PÉREZ-CRESPO I.; RODRÍGUEZ E.; PERTEGUER M. J.; GÁRATE T.; GONZÁLEZ-BARBERÁ E. M.; MAS-COMA S.

Assessing the validity of an ELISA test for the serological diagnosis of human fascioliasis in different epidemiological situations. *Trop. Med. Int. Health.*, 17(5): 630-636, 2012.

VELÁSQUEZ L. E. Synonymy between *Lymnaea bogotensis* Pilsbry, 1935 and *Lymnaea cousini* Jousseume, 1887 (Gastropoda: Lymnaeidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 101(7): 795-799, 2006.

VIEIRA N. P.; FARIA P. B.; MATTOS M. R.; PEREIRA A. A. Condemnation of bovine liver in the southern region of the State Espírito Santo, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 63(6): 1605-1608, 2011.

VILLAVICENCIO A.; VASCONCELLOS M. C. First report of *Lymnaea cousini* Jousseume, 1887 naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Machachi, Ecuador. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100(7): 735-737. 2006.

VINARSKI M. One, two, or several? How many lymnaeid genera are there? *Ruthenica*. 23(1): 41-58, 2013.

WATANABE S.; NAGAYAMA F.; IWATA K. Simple detection technique for *Fasciola* ova. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 6: 176-177, 1953.

YAMAGUTI, S. *Systema Helminthum*. Vol. III. The Nematodes of Vertebrates. Interscience Publishers, Inc., New York, 1261 pp, 1961.

ZHANG W. Y.; MOREAU E.; UOPE J. C.; HOWARD C.J.; HUANG W. Y.; CHAUVIN A. *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: Comparison of cellular response to experimental infection in sheep. *Exp. Parasitol.*, 111: 154-159, 2005.